

UCH-FC  
MAG-B  
M828  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE POSTGRADO

**“LINFOCITOS B DE MEMORIA EN EL LUPUS ERITEMATOSO  
SISTÉMICO”**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas**

por

**MARÍA JOSÉ MORALES CODELIA**

**Enero 2015**

**Santiago - Chile**

**Director de Tesis: Dra. María Rosa Bono Merino**

**Co-Director de Tesis: Dr. Mario Roseblatt Silber**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

**María José Morales Codelia**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 10 de diciembre del 2014.

*Dra. María Rosa Bono Merino*

**Director de Tesis**

*Dra. Mario Roseblatt Silber*

**Co-Director de Tesis**

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

*Prof. Marco Tulio Núñez*

**Presidente Comisión**

*Dr. Alfredo De Ioannes*

**Evaluador**

Santiago de Chile, Diciembre 2014

## BIOGRAFÍA



Nací un día 15 de abril del año 1989 en Santiago. Mi papá, por alguna razón real que aún no me dice, me puso por nombre María José. Mi mamá quería que me llamara Mariana, pero de todas formas mi papá llegó primero al registro civil. Desde aquel entonces somos tres en la familia y siempre hemos vivido en Quinta Normal. Fui al jardín Nido Alegre, luego al colegio Bernardo O'Higgins y después al colegio de monjas María Luisa Villalón en Santiago Centro, donde cursé primero hasta sexto básico. Entre esos lugares y mi hogar viví mi infancia. Me caractericé por ser una niña alegre, responsable, mandona y traviesa. Siempre he vivido con algún gato de mascota. Si bien soy hija única, viví y disfruté muchos veranos y vacaciones en la casa de mis tíos Sonia y Víctor.

A los 17 años ya tenía decidido que entraría a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, gracias a mi prima Verónica. La

etapa universitaria es lejos la más linda y desafiante. Es verdad decir que en la U no se duerme estudiando, que no salía porque tenía prueba en dos semanas, que viví más tiempo en hogares de mis compañeros que en mi casa, etc. Mi papá me transportó en el Renault 18TL de siempre de acá para allá en calidad de bulto, pues no dormía nada. La parte linda de la historia fue que aquí tuve la suerte, dicha y fortuna de conocer a Patricio, quien ha sido mi apoyo incondicional, mi amigo y mucho más que eso. En este resumen de mi vida, él se lleva hasta el momento ya 7 lindos años, los que espero sean muchos más.

A mis 25 años y mirando hacia atrás, me doy cuenta de que tengo la tendencia inconsciente de escoger el camino más difícil. Luego de egresar y titularme de Ingeniera en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile en el Laboratorio de Inmunología, decidí continuar mis estudios y cursar el Magíster en Ciencias Biológicas en el mismo lugar para perfeccionar mis conocimientos de citometría de flujo. El camino fue bastante sinuoso y requirió de mucho esfuerzo y superación, sin embargo, logré llegar a la meta. En mi recuerdo quedará la imborrable marca del viaje familiar hacia la ciudad que nunca duerme y la visita a la estatua de Rocky Balboa, símbolos que reflejan que todo gran esfuerzo finalmente tiene un premio a cambio.

No me da miedo el futuro. Al contrario. Creo que, como alguien dijo por ahí, soy la arquitecta de mi propio destino. ¿Por qué negarse a cada nueva aventura que nos ofrece la vida?

MJMC. Enero, 2015.

## AGRADECIMIENTOS

Con certeza me faltarán hojas para poder expresar mi gratitud a tantas personas que han estado presente en este largo camino.

En primer lugar, quiero agradecer a Dios y a mis padres José Hugo Morales Barraza y Ana del Carmen Codelia Contreras por haberme traído a este mundo. Los escribo con nombre y apellido, pues tras ellos está la historia y una serie de sucesos que mis antepasados vivieron tales que hoy me permiten escribir estas líneas. A ustedes les agradezco infinitamente por haberme cuidado y guiado con muchísimo amor en este camino que es la vida. Por haberme aguantado en mis travesuras de la infancia y por haberme corregido cuando lo necesité. Les agradezco hasta el día de hoy por estar siempre allí. A mi padre le agradezco su sencillez, sus enseñanzas de hacer las cosas si es que se cree que valen la pena y que la vida es simple. A mi madre, le doy gracias por todo el incansable esfuerzo, lucha y trabajo con el que enfrenta la vida día a día, desde muy temprano en la mañana. Gracias por ser el ejemplo.

Nunca me molestó ser hija única. Pienso que si la vida no te da hermanos, te da primos. Y al respecto, no puedo dejar de agradecer a mis queridísimos tíos Sonia Arce y Víctor Codelia, quienes me acogieron en su hogar como una hija más. Gracias por haber sido un ejemplo de amor en la familia, de constante apoyo y compañía. Gracias por haber estado también en todos los momentos importantes de mi vida, por todas las navidades, años nuevos y cumpleaños que hemos pasado juntos. Quiero agradecer a mis primos Ángel, Cristian, Verónica, David y Beatriz por acogerme siempre y por darme una ENORME muestra de hermandad. A Verónica, especialmente, le doy las

gracias por ser como una hermana mayor, por haberme mostrado cómo se comienza el camino de la ciencia, por mostrarme que esta carrera existía y por haberme enviado todos los papers que te pedí relacionados con mi tesis. También quiero agradecer a mi madrina de confirmación Solange Vergara por sus conocimientos en Biología y las útiles discusiones y consejos recibidos.

A Patricio L'Huissier. En este momento le agradezco a Dios nuevamente porque te puso en mi camino, y por más que existan curvas en él, sé que estarás ahí, como desde ya hace varios años empezaste a estar. Gracias por el inmenso amor e infinita paciencia que me has demostrado. ¡Te amo!

En el ámbito científico, quiero agradecer a la profesora María Rosa Bono por haberme aceptado en el laboratorio y por mostrarme hasta hoy que el camino de la ciencia a pesar de ser tortuoso es también lindo y desafiante; y que hay que desarrollar tolerancia a las frustraciones. Particularmente, quiero dar las gracias a las personas con las que trabajé directamente: Yessia Hidalgo: gracias por acompañarme hasta tardísimo, por escucharme, aconsejarme, darme ánimo y por contarme las travesuras de tu gata. Camila Fuentes y Natalia Crisóstomo: ¡¡gracias por las células!!, y por ayudarme a usar el citómetro cuando lo necesité. Gabriela Tejón: gracias por haberme enseñado a sacar placas de Peyer y haberte quedado conmigo hasta tardísimo. Constanza Miller, Felipe Flores y Dominique Fernández: gracias por haberme enseñado a usar FlowJo. Y al laboratorio en general: ¡Muchísimas gracias por su infinita paciencia y por esperarme cuando no tenía llaves para cerrar!, gracias a Pamela Palma, Leonardo Vargas, Zoila Lobos y Óscar Arriagada por su trabajo.

Santiago, Enero del 2015.

*"If I can make it there, I'll make it anywhere". Frank Sinatra.*

相信自己

*"Confía en tí mismo"*

*A mis queridos padres*

*José Hugo y Ana del Carmen,*

*a quienes les debo cada logro en mi vida.*

*A Patricio L'Huissier G.,*

*quien me ha apoyado incondicionalmente.*

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado a través de los proyectos FONDECYT 1100557, y Beca Magíster Nacional 2012 CONICYT.

## INDICE DE CONTENIDO

BIOGRAFÍA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
FINANCIAMIENTO .....	vii
INDICE DE CONTENIDO.....	viii
INDICE DE FIGURAS .....	x
INDICE DE TABLAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
1. El sistema inmune .....	1
1.1. Origen de los linfocitos B y su rol en la respuesta inmune.....	2
1.2. Linfocitos B y memoria inmunológica.....	4
1.3. Linfocitos B en el timo. ....	8
2. Autoinmunidad: pérdida de la tolerancia a lo propio. ....	8
3. El lupus eritematoso sistémico. ....	10
4. Contribución de los linfocitos B a la patogénesis del lupus. ....	11
4.1. Linfocitos B de memoria en el lupus. ....	12
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
1. Ratones.....	15
2. Obtención de células a partir de órganos linfoides.....	15
3. Citometría de flujo. Marcaje de superficie.....	16
4. Activación de esplenocitos y marcaje intracelular para la detección de IL-10. ....	17
5. Protocolo de inmunización de ratones.....	18
6. ELISA para la detección de anticuerpos anti-OVA.....	18
7. Purificación de sub-poblaciones de linfocitos B de bazo por <i>cell sorting</i> .....	19
8. Cultivo y activación de sub-poblaciones de linfocitos B. ....	20
9. Detección de citoquinas mediante CBA (Cytometric Bead Array).....	20

RESULTADOS.....	21
1. Análisis en diferentes órganos linfoides de las poblaciones de linfocitos B de memoria en ratones inmunizados. ....	21
2. Los linfocitos B de memoria activados <i>in vitro</i> producen IL-10, IL-6 y TNF. ....	28
3. Los linfocitos B de memoria activados <i>in vitro</i> expresan marcadores de centros germinales y se diferencian a células pre-plasmáticas. ....	30
4. Los linfocitos B de memoria clásicos activados <i>in vitro</i> expresan moléculas de coestimulación y los marcadores CD80, CD73 y PD-L2. ....	31
5. Análisis de las sub-poblaciones de linfocitos B en ratones lúpicos y controles. ....	36
6. Los ratones lúpicos presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos IgM- IgD- en los órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles. ....	38
7. Los ratones lúpicos presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B que forman centros germinales en órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles. ....	44
8. Los linfocitos B de memoria presentes en los diferentes órganos linfoides expresan CD73 en ratones lúpicos y controles. ....	47
9. Fenotipo de los linfocitos B activados del bazo de ratón lúpico. ....	50
10. Los linfocitos B de memoria de ratones lúpicos activados producen las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF. ....	55
11. Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de la zona marginal CD21+ CD23- en comparación a ratones controles. ....	58
12. Los linfocitos B de la zona marginal CD21+ CD23- producen IL-10 en los ratones lúpicos y controles. ....	64
DISCUSION.....	66
Caracterización de los linfocitos B de memoria murinos. ....	66
Linfocitos B de memoria en el lupus. ....	71
RESUMEN DE RESULTADOS .....	84
CONCLUSION .....	87
REFERENCIAS .....	88

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. El proceso de cambio de clase de inmunoglobulina en los linfocitos B es mediado por CD39 y CD73. ....	7
Figura 2. Producción de anticuerpos anti-ovoalbúmina en el suero de ratones inmunizados. ....	24
Figura 3. Los ratones inmunizados presentan un aumento en el porcentaje y número absoluto de linfocitos B totales en el timo. ....	25
Figura 4. Subpoblaciones de linfocitos B en diferentes órganos en ratones inmunizados. ....	27
Figura 5. Los linfocitos B de memoria activados <i>in vitro</i> producen las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF. ....	29
Figura 6. Los linfocitos B de memoria al activarse expresan marcadores de centros germinales y se diferencian a células pre-plasmáticas. ....	32
Figura 7. Los linfocitos B que han hecho el cambio de isotipo CD19+ IgM- IgD- al activarse expresan moléculas de coestimulación y los marcadores de memoria CD80, PD-L2 y CD73. ....	34
Figura 8. Los ratones lúpicos presentan un aumento de linfocitos B totales en los órganos linfoides comparado a ratones controles. ....	37
Figura 9. Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos en los órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles. ....	41
Figura 10. Los ratones lúpicos presentan linfocitos B de memoria IgA+ en ganglio mesentérico y placas de Peyer. ....	43
Figura 11. Los ratones lúpicos presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B que forman centros germinales en órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles. ....	46
Figura 12. Los linfocitos B de memoria expresan CD73 en los órganos linfoides de ratones controles y lúpicos. ....	49
Figura 13. Los linfocitos B de memoria de ratón lúpico al activarse expresan marcadores de centros germinales y se diferencian a células pre-plasmáticas. ....	52
Figura 14. Los linfocitos B de memoria clásicos del bazo de un ratón lúpico al activarse presentan una baja expresión de PD-L2. ....	54
Figura 15. Los linfocitos B de memoria de ratones lúpicos activados producen las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF. ....	56
Figura 16. Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de la zona marginal CD21+ CD23- en los órganos linfoides secundarios en comparación a ratones controles. ....	62
Figura 17. Los linfocitos B de la zona marginal CD21+CD23- producen IL-10 en ratones controles y lúpicos. ....	65

## INDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación entre los linajes B-1 y B-2 de linfocitos B.....	3
Tabla II. Anticuerpos monoclonales anti-ratón utilizados.....	16
Tabla III. Características principales de los linfocitos B de ratones inmunizados y activados <i>in vitro</i> .....	35
Tabla IV. Características principales de los linfocitos B de ratón lúpico activados <i>in vitro</i> .....	57
Tabla V. Resumen de las características esenciales de los linfocitos B de memoria en ratones lúpicos (NZB x NZW) F1.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido DesoxirriboNucleico  
APC: *Allophycocyanin*  
ARN: Ácido RiboNucleico  
ATP: Adenosina Tri-fosfatada  
BCR: *B Cell Receptor*  
CBA: *Cytometric Bead Array*  
CD: *Cluster of Differentiation*  
CpG: oligonucleótido de ADN rico en Citosina y Guanina unidos por un puente fosfato  
CXCL: *CXC-Chemokine Ligand*  
CXCR: *CXC-Chemokine Receptor*  
ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
Fc: Fracción cristalizable de la inmunoglobulina  
FCS: *Fetal Calf Serum*  
FITC: *Fluorescein isothiocyanate*  
FO: Linfocito B Folicular  
GC: Centros Germinales  
HRP: *HorseRadish Peroxidase*  
Ig: Inmunoglobulina  
IL: Interleuquina  
MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein*  
MHC-II: *Major Histocompatibility Complex- II*  
MLN: Ganglio mesentérico  
MZ: Linfocito B de la Zona Marginal  
NZB: *New Zealand Black*  
NZW: *New Zealand White*  
OVA: Ovoalbúmina  
PBS: Solución fosfato salina  
PE: *Phycoerythrin*  
Pe Cy7: *Phycoerythrin Cyanine 7*  
PI: Yoduro de Propidio  
PLN: Ganglios periféricos

PMA: *Phorbol Myristate Acetate*

RBC: *Red Blood Cell*

RPMI: Roswell Park Memorial Institute-medio de cultivo

SLE: *Systemic Lupus Erythematosus*

Th: *T helper*

TLR: *Toll Like Receptor*

TMB: *Tetramethylbenzidine*

TN: Linfocito B de Transición

TNF- $\alpha$ : *Tumor Necrosis Factor-alpha*

## RESUMEN

Una de las funciones clave de los linfocitos B es la producción de anticuerpos, la cual es mediada por células plasmáticas y reforzada por la persistencia de sus precursores: *los linfocitos B de memoria*. Los linfocitos B de memoria que producen auto-anticuerpos patogénicos son considerados cruciales en el desarrollo y mantención de enfermedades autoinmunes.

Los linfocitos B de memoria en humanos han sido caracterizados como células que expresan CD27 y moléculas propias de linfocitos B, sin embargo, en ratones no se conocen marcadores que permitan distinguir esta población. El conocimiento detallado del fenotipo de estas células de memoria puede contribuir al mejoramiento del desarrollo de vacunas y a un mayor entendimiento de las patologías autoinmunes.

El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica de etiología desconocida caracterizada por la producción de auto-anticuerpos que reconocen antígenos propios como el ADN de doble hebra y otros antígenos nucleares. Esto lleva a la formación de complejos inmunes que se depositan en diferentes órganos y tejidos y reclutan a agentes efectores inflamatorios adicionales, contribuyendo a la nefro-toxicidad característica del lupus.

En este trabajo utilizamos un protocolo de inmunización estándar para caracterizar los linfocitos B de memoria en ratones, puesto que su fenotipo no ha sido del todo elucidado. Existen dos sub-poblaciones de linfocitos B de memoria: los linfocitos B de memoria clásicos IgM-IgD- y los linfocitos B de memoria IgM+ de larga vida. En este modelo encontramos que los linfocitos B de memoria activados producen IL-10, IL-6 y TNF. Los linfocitos B de memoria clásicos producen menos IL-10 e IL-6

que los linfocitos B de memoria IgM+. Los linfocitos B de memoria clásicos, a diferencia de los linfocitos B vírgenes, al ser activados *in vitro* expresan CD80, CD73 y PD-L2, marcadores asociados a memoria. Los linfocitos B de memoria IgM+ expresan menores niveles de estas moléculas.

Posteriormente y como objetivo principal estudiamos las características de los linfocitos B de memoria de ratones que desarrollan lupus para determinar si estos son normales o se encuentran alterados. Para esto purificamos los linfocitos B de memoria a partir del bazo de un ratón lúpico y al activarlos encontramos un patrón similar de producción de citoquinas en comparación a los ratones inmunizados. Además encontramos que la población de linfocitos B de memoria clásicos activados expresa altos niveles de CD80 y CD73, sin embargo presenta una disminución en la expresión de PD-L2, cuya deficiencia podría reflejar fallas en mecanismos de supresión de la respuesta inmune, contribuyendo a la condición de autoinmunidad.

Paralelamente estudiamos otras características que nos permitan comprender cuáles son los posibles defectos que presentan los linfocitos B de memoria en el lupus. Los ratones lúpicos presentan un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos en el bazo mientras que los linfocitos B de memoria IgM+ no presentaron diferencias significativas comparado a ratones controles. En ganglio mesentérico, placas de Peyer y ganglios periféricos el porcentaje de linfocitos B de memoria IgM+ aumenta comparado a ratones controles. El timo de ratones lúpicos presenta un aumento de linfocitos B totales y una disminución en los linfocitos B de memoria clásicos mientras que los linfocitos B de memoria IgM+ y los linfocitos B vírgenes aumentan.

Los órganos linfoides secundarios de ratones lúpicos poseen un aumento exacerbado de linfocitos B GL7+ CD95+, los cuales forman centros germinales, donde se generan linfocitos B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. En estos ratones además encontramos un incremento en el porcentaje de linfocitos B de la zona marginal de fenotipo CD21+ CD23- IgM+ CD1d+, los cuales al activarse producen IL-10 y formarían parte de la población de linfocitos B de memoria que mantienen el isotipo IgM+.

La presencia de una mayor frecuencia de linfocitos B de memoria y de centros germinales en ratones lúpicos en conjunto con las características fenotípicas de las células encontradas en este trabajo podría dar cuenta de deficiencias en la mantención de la homeostasis del sistema inmune, contribuyendo al desarrollo de la patología del lupus.

## ABSTRACT

One of the key functions of B lymphocytes is antibody production, which is mediated by plasma cells and reinforced by the persistency of their precursors: *memory B cells*. Memory B cells that produce pathogenic autoantibodies are considered to be very important in the development and maintenance of autoimmune diseases.

In humans, memory B cells have been characterized as cells expressing CD27 and common markers of B cells, however, in mice there are no known markers that allow us to distinguish memory B cells. The detailed knowledge of the memory B cells phenotype can contribute to the development of better vaccines and to a better understanding of autoimmune pathologies.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory chronic disease of unknown etiology characterized by the production of auto-antibodies reacting against self antigens such as double stranded DNA and other nuclear antigens. This leads to the formation of immune complexes that are accumulated in different organs and tissues recruiting additional inflammatory effector agents that contribute to the characteristic nephro-toxicity of lupus.

In this work we used a standard immunization protocol to characterize memory B cells in mice because their phenotype has not been completely elucidated. There are two subsets of memory B cells: memory B cells classically defined as IgM-IgD- and long-lived IgM+ memory B cells. In this model we found that activated memory B cells produced IL-10, IL-6 and TNF. Classic memory B cells produced less IL-10 and IL-6 than IgM+ memory B cells. Classic memory B cells, unlike naïve B cells, when activated

*in vitro* expressed memory-associated markers CD80, CD73 and PD-L2. IgM+ memory B cells expressed lower levels of these molecules.

We then studied the characteristics of memory B cells in lupic mice to determine if these are normal or altered. To do this we purified memory B cells from the spleen of a lupic mouse and activated them. We found a pattern of cytokine production similar to immunized mice and found that activated classic memory B cells expressed high levels of CD80 and CD73 but a decreased level of PD-L2. This deficiency could reflect failures in suppression mechanisms of the immune response, contributing to an autoimmune condition.

We also studied other characteristics that could help us to understand the possible defects that memory B cells present in lupus. Lupic mice have a significant increase of the percent of classic memory B cells in spleen while IgM+ memory B cells do not present a significant difference when compared to control mice. The percentage of IgM+ memory B cells increases in mesenteric lymph node, Peyer patches and peripheral lymph nodes in contrast to control mice. The thymus of lupic mice presents an increase of total B cells and a decrease in classic memory B cells while IgM+ memory and naïve B cells are increased.

Secondary lymphoid organs from lupic mice have an exacerbated increase of GL7+CD95+ B cells, which form germinal centers and generate classic memory B cells and antibody-producing plasma cells. In these mice we also found an increase in the percent of marginal zone B cells with a CD21+CD23-IgM-CD1d+ phenotype, which produce IL-10 when are activated and could form part of IgM+ memory B cell pool.

The increase in the frequency of memory B cells and germinal centers together with the phenotype of memory B cells found in lupic mice could reflect deficiencies in homeostasis maintenance of the immune system, contributing to the development of the lupus pathology.

## INTRODUCCIÓN

El lupus es un trastorno autoinmune que afecta a las articulaciones, la piel, los riñones, la sangre y otras partes del cuerpo. Para comprender esta patología necesitamos conocer previamente el funcionamiento normal del sistema inmune.

### 1. El sistema inmune.

El sistema inmune comprende el conjunto de elementos responsables de protegernos de patógenos como bacterias, virus, hongos y de eliminar células cancerosas. Además es el encargado de mantener la tolerancia frente a aquellos elementos propios o no propios que no representen un peligro para la integridad del individuo.

La invasión por parte de un agente infeccioso desencadena en primer lugar los mecanismos de respuesta defensivos del sistema inmune innato, mientras que posteriormente se desencadena la respuesta inmune adaptable. Esta respuesta se caracteriza por ser específica frente a diversas moléculas y por poseer *memoria inmunológica*, la cual permite aumentar la magnitud y capacidad defensiva de cada respuesta frente a exposiciones sucesivas del agente infeccioso. La inmunidad adaptativa es mediada por la generación de linfocitos B y linfocitos T que producen anticuerpos o citoquinas, respectivamente, los cuales facilitan el desarrollo de la respuesta inmune (Abbas y cols., 2008). En este trabajo nos enfocaremos en el estudio de la población de linfocitos B.

## **1.1. Origen de los linfocitos B y su rol en la respuesta inmune.**

La efectividad de la respuesta inmune adaptativa requiere la generación de anticuerpos capaces de reconocer una alta diversidad de antígenos. Los linfocitos B son las células que poseen un papel clave en el proceso de producción de anticuerpos.

Los linfocitos B se producen continuamente a lo largo de nuestra vida, originándose inicialmente en el hígado fetal y luego a partir de células madre de la médula ósea (Busslinger, 2004). Una de las características clave de la diferenciación hacia el linaje de linfocito B es la iniciación de re-arreglos en los genes de las cadenas pesadas y livianas que conforman las inmunoglobulinas y la expresión de factores de transcripción maestros como Pax5 (Nutt y Knee, 2007). Una vez formados, los linfocitos B migran a través del flujo sanguíneo al bazo y recirculan entre los folículos linfoides del bazo y los linfonodos periféricos, ejerciendo una función crucial en la respuesta inmune (Carsetti y cols., 2004).

Los linfocitos B pueden ser clasificados en dos linajes: B-1 y B-2. Existe un debate respecto a si ambas poblaciones derivan desde un progenitor común o no, sin embargo, cada linaje posee papeles diferentes en la inmunidad humoral (Montecino-Rodriguez y Dorshkind, 2012). Por otra parte, existen diferencias en la generación de la diversidad del receptor BCR y del nicho anatómico donde estas se localizan, las cuales se muestran en la Tabla I. Las características funcionales y fenotípicas de los linfocitos B-1 han sido estudiadas en modelos murinos, pero el análogo en humanos ha sido descrito sólo recientemente (Griffin y cols., 2011). Por otro lado, los linfocitos B-2 han sido caracterizados con mayor profundidad en humanos y en ratones. En esta tesis nos enfocaremos en el estudio de los linfocitos B-2.

Tabla I. Comparación entre los linajes B-1 y B-2 de linfocitos B.

<b>Ontogenia y función</b>	<b>B-1</b>	<b>B-2</b>
Funciones principales	Barrera inmune rápida, anticuerpos naturales, respuestas TI.	Respuesta inmune adaptativa, memoria inmunológica, vigilancia, respuestas TD y TI.
Ubicación anatómica	Bazo y mucosas	Órganos linfoides secundarios, circulación sanguínea.
Desarrollo	Hígado fetal y médula ósea en adultos. Auto-renovación en la periferia.	Generación continua en la médula ósea.
Sub-poblaciones principales	B-1a, B-1b	Foliculares (FO), de la zona marginal (MZ), de transición (TN)
Isotipo de anticuerpos secretados	IgM, IgA	IgG, IgM, IgA, IgE

TD, TI: respuesta dependiente e independiente de linfocitos T.

(Modificado de Naradikian y cols., 2014).

Los linfocitos B además del rol clave que poseen en la producción de anticuerpos pueden ejercer otras funciones importantes, como son la presentación de antígenos a linfocitos T CD4+ previamente estimulados por las células dendríticas y la producción de citoquinas. Al ejercer su papel como APC (*Antigen Presenting Cell*), los linfocitos B pueden dirigir la respuesta inmune hacia Th2 (Macaulay y cols., 1997). Al activarse, los linfocitos B pueden producir citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF y linfotóxina- $\alpha$ ), factores de crecimiento hematopoyéticos (GM-CSF e IL-7) y citoquinas inmunosupresoras (TGF- $\beta$ 1 e IL-10) (Zhang y cols., 2014).

## 1.2. Linfocitos B y memoria inmunológica.

Los linfocitos B pueden reconocer un antígeno directamente, activarse y diferenciarse a célula plasmática, o bien realizar este proceso con la ayuda de linfocitos T cooperadores (Th o *T-helper*), los cuales fueron previamente activados por una célula dendrítica. Se dice entonces que los linfocitos B pueden diferenciarse en forma T-independiente o T-dependiente. La característica de la respuesta inmune T-dependiente es la formación de centros germinales. Los centros germinales son estructuras transientes que se originan en los órganos linfoides secundarios en las regiones ricas en linfocitos B llamadas folículos, donde se produce el cambio de clase de las inmunoglobulinas y la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Los linfocitos B activados interactúan con linfocitos T que han sido activados por una célula dendrítica que le presenta al linfocito T el mismo antígeno que activó al linfocito B inicialmente. La interacción de los linfocitos B y T antígeno-específicos produce la proliferación y diferenciación de los linfocitos B conducentes a la producción de células plasmáticas. Durante este proceso, una parte de estos linfocitos sigue un programa de diferenciación distinto ya que son capaces de reconocer factores de supervivencia, dando origen a los *linfocitos B de memoria*. Estas células se caracterizan por persistir durante períodos prolongados y generar respuestas inmunes más rápidas y eficientes frente a un re-encuentro con el agente patógeno (Tarlinton, 2006; Shlomchik y cols., 2012). Dentro de los linfocitos T también existen células de memoria, las que residen en los tejidos y proveen protección inmediata ante una nueva infección mediante la activación de sus funciones efectoras (Sallusto y cols., 2010).

La memoria inmunológica se ve reflejada en diferencias cualitativas y cuantitativas entre la respuesta inmune que ocurre después de la primera exposición al

antígeno comparada con la que ocurre posterior a la re-exposición frente al antígeno. Las respuestas de memoria son más rápidas, de mayor magnitud y comprenden la producción de anticuerpos de mayor afinidad. La formación y mantenimiento de los linfocitos B de memoria son de gran importancia para el diseño de vacunas y para el tratamiento de inmunodeficiencias (Tarlinton, 2006; Bevan, 2011).

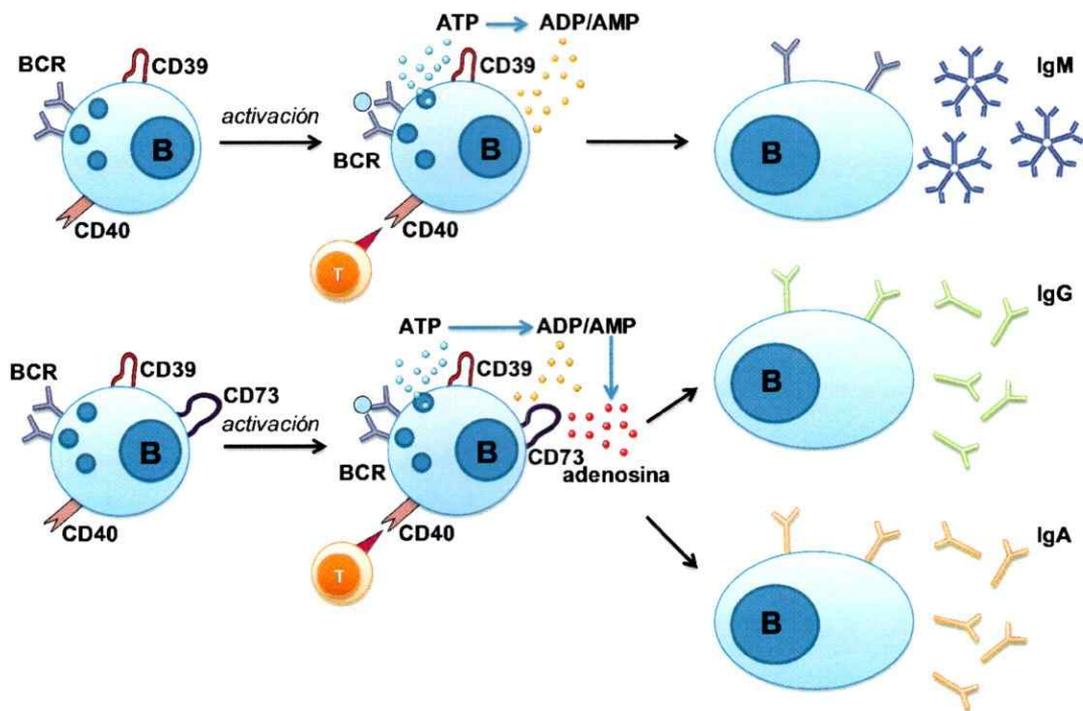
Los linfocitos B poseen un receptor formado por una inmunoglobulina de membrana (BCR) a través del cual reconocen los antígenos. Los linfocitos B vírgenes expresan las inmunoglobulinas IgM e IgD. La primera exposición frente a un antígeno activa al linfocito B, produce la degradación de IgD (Black y cols., 1980; Preud'homme y cols., 2000) e induce una respuesta inmune que es inicialmente dominada por la producción de anticuerpos del isotipo IgM. A medida que la respuesta progresa, los linfocitos B que entran en los centros germinales editan sus genes de las inmunoglobulinas a través de procesos de hiper-mutación somática y cambio de clase o de isotipo, produciendo anticuerpos IgG, IgE e IgA (Naito y cols., 2007; Di Noia, 2007). El estudio de los linfocitos B de memoria se ha enfocado clásicamente en la población de células que ha sufrido el proceso de cambio de clase de isotipo de la inmunoglobulina. Sin embargo, en los últimos años se han identificado nuevas subpoblaciones, donde se destaca la importancia de las células de memoria que conservan el isotipo inicial IgM (Weill y cols., 2013). Los linfocitos B de memoria IgM+ se forman independientemente de los centros germinales y son de larga vida, otorgando protección a largo plazo (Dogan y cols., 2009; Pape y cols., 2011) a diferencia de los linfocitos B IgG+.

Los linfocitos B de memoria han sido caracterizados en humanos por la expresión de la molécula de superficie CD27 (proteína de la familia de receptores de

TNF) en conjunto con marcadores propios de los linfocitos B (Klein y cols., 1998), sin embargo, en ratones no se conocen marcadores que permitan distinguir linfocitos B de memoria. Una aproximación para estudiar los linfocitos B de memoria en modelos murinos ha sido la utilización de ratones cuyos linfocitos B poseen un receptor BCR transgénico de especificidad conocida. Este sistema permite la generación de linfocitos B de memoria en altas frecuencias luego de inmunizar los animales. Utilizando este tipo de modelos murinos se ha observado que no existe una expresión diferencial del marcador CD27 entre linfocitos B vírgenes y linfocitos B experimentados o activados (Anderson y cols., 2007). Esto se correlaciona con un estudio anterior de Xiao y cols., donde se encontró que los linfocitos B que expresan CD27 poseen una menor frecuencia de hiper-mutaciones somáticas que los linfocitos B que no expresan CD27 (Xiao y cols., 2004). Por lo tanto, el marcador de superficie CD27 no parece correlacionarse con una población de linfocitos B de memoria en ratones. La contribución de los linfocitos B de memoria murinos a las enfermedades autoinmunes no ha sido elucidada del todo debido a la falta de marcadores de superficie que los definan (Bergmann y cols., 2013).

La diversificación del isotipo de inmunoglobulina mediante el proceso de recombinación es esencial para el desarrollo de la respuesta inmune humoral. Recientemente se ha descrito que la adenosina extracelular, derivada del metabolismo del ATP, contribuye indispensablemente a que el proceso de recombinación sea llevado a cabo en los linfocitos B. En estas células la estimulación coordinada del BCR, de los receptores de tipo Toll (TLR) y del receptor CD40 conduce a la liberación de ATP almacenado en vesículas sensibles al calcio. Posteriormente las enzimas de transmembrana con actividad ecto-nucleotidasa CD39 y CD73 actúan en tándem y

degradan el ATP a adenosina, la cual es sensada en forma autocrina por el linfocito B e induce el proceso de cambio de isotipo (Figura 1) (Sчена y cols., 2013).



**Figura 1. El proceso de cambio de clase de inmunoglobulina en los linfocitos B es mediado por CD39 y CD73.** La activación de los linfocitos B mediante señalización del BCR y del receptor CD40 induce la liberación de ATP almacenado en vesículas sensibles al calcio. El ATP es degradado a AMP por CD39 y CD73 lo hidroliza a adenosina como producto final, el cual es sensado por el linfocito B en forma autocrina e induce la recombinación de genes de inmunoglobulina. Modelo propuesto por Sचना y cols., 2013.

### **1.3. Linfocitos B en el timo.**

El timo es el órgano linfoide central donde ocurre la diferenciación y selección de linfocitos T. Estos procesos están dirigidos por la interacción entre el receptor del linfocitos T y las moléculas MHC-II expresadas por células presentadoras de antígeno intra-tímicas. La literatura reciente describe que en el timo también se encuentran presentes otras APCs como es el caso de los linfocitos B (Walters y cols., 2014).

En un timo normal se puede encontrar una baja proporción de linfocitos B, sin embargo, en condiciones patológicas que incluyen enfermedades autoinmunes la migración de linfocitos B desde la periferia hacia el timo se ve altamente aumentada (Hodge y cols., 2012). Lo anterior genera una incógnita interesante respecto de cuál es el papel que cumplen los linfocitos B en el timo.

## **2. Autoinmunidad: pérdida de la tolerancia a lo propio.**

El sistema inmune posee la capacidad de prevenir el desarrollo de respuestas inmunes frente a antígenos propios, proceso que definimos como tolerancia. Sin embargo, pueden ocurrir fallas en la tolerancia de los linfocitos B hacia estos antígenos, originándose de esta forma las enfermedades autoinmunes (Lleo y cols., 2010).

Dentro del diverso repertorio de receptores BCR con afinidad por diferentes antígenos, alguno de estos presentará reactividad contra antígenos propios. En el linaje de los linfocitos B, las células auto-reactivas son eliminadas en la médula ósea (tolerancia central) y en el bazo (tolerancia periférica). Los mecanismos de tolerancia central excluyen por selección negativa a los linfocitos B inmaduros auto-reactivos, impidiendo su salida hacia la periferia. También existen mecanismos de selección

positiva, donde los linfocitos B inmaduros normales pueden emigrar y poblar los compartimentos periféricos. Una vez que este punto de control es superado exitosamente los linfocitos B inmaduros se diferencian a células maduras en el bazo, generando un repertorio de linfocitos B vírgenes capaces de reaccionar frente a antígenos foráneos (Gururajan y cols., 2014). Sin embargo, una fracción de linfocitos B inmaduros auto-reactivos, los cuales mantienen una baja afinidad por antígenos propios, pueden escapar el control de tolerancia y migrar hacia la periferia (Hardy y cols., 2012).

La edición del BCR es otro mecanismo de inducción de tolerancia que ocurre en la médula ósea. Los linfocitos B auto-reactivos inmaduros pueden editar su BCR, reactivando su programa de re-arreglo genético de la cadena liviana de la inmunoglobulina. Este proceso resulta en la expresión de un nuevo BCR con afinidad por antígenos externos, lo que les permite a los linfocitos B "editados" migrar hacia la periferia (Tiegs y cols., 1993).

Dentro de los mecanismos de tolerancia periférica se encuentra la selección de los linfocitos B según la especificidad del BCR y la intensidad de la señal que se produce al ser activados. Si un linfocito B auto-reactivo logra llegar a la periferia y se activa frente a un antígeno propio con una señal intensa será eliminado (Miller y cols., 2006). Este mecanismo es plástico y la selección dependerá además de la capacidad del linfocito B de sensor el factor de supervivencia BAFF (*B-cell activating factor*) (Scholz y cols., 2013).

La susceptibilidad genética, factores medioambientales y fallas de los mecanismos de inducción de tolerancia previamente mencionados generan

enfermedades autoinmunes (Luning-Prak y cols., 2011). Las patologías autoinmunes incluyen más de 70 enfermedades diferentes, las cuales afectan aproximadamente el 5% de la población occidental. Se caracterizan principalmente por presentarse en mujeres y afectan de manera importante la calidad de vida (Moroni y cols., 2012). En esta tesis nos enfocaremos en particular en el estudio del lupus.

### **3. El lupus eritematoso sistémico.**

El lupus eritematoso sistémico (SLE) es un desorden autoinmune multi-sistémico donde participan factores ambientales y genéticos que conducen a la pérdida progresiva de tolerancia hacia antígenos propios a lo largo del tiempo, culminando finalmente en el desarrollo de la patología clínica. Este trastorno presenta manifestaciones clínicas heterogéneas, produciéndose períodos de exacerbación y remisión, donde los síntomas desaparecen en forma parcial o total (Obermoser y Pascual, 2010).

En el lupus se produce un estado de inflamación crónico caracterizado por la producción de auto-anticuerpos capaces de reconocer antígenos propios tales como ADN de doble hebra, histonas, ribonucleoproteínas y con una prevalencia inferior se producen anticuerpos anti fosfolípidos, eritrocitos, y plaquetas (Hahn y Wallace, 2012). Uno de los factores que contribuyen al desarrollo de autoinmunidad es la eliminación inapropiada de células apoptóticas, las cuales se transforman en una fuente de auto-antígenos presentados por las células dendríticas a los linfocitos T, activando células T auto-reactivas que activarán linfocitos B auto-reactivos. Los auto-anticuerpos formarán complejos inmunes con auto-antígenos, los cuales se depositarán en los tejidos y

activarán componentes del complemento o células fagocíticas que finalmente destruirán el tejido (Muñoz y cols., 2010; Townsend y cols., 2010).

En el lupus existe una contribución genética compleja, donde se han identificado diversos locus de susceptibilidad, sin embargo se estima que a la fecha sólo se conoce el 10% de estos genes. Entre estos se conocen: genes del MHC-II involucrados en la presentación de antígenos a linfocitos T CD4+, moléculas de señalización presentes en linfocitos T y B activados, moléculas del complemento involucradas en la eliminación de células apoptóticas y complejos inmunes, etc (Obermoser y Pascual, 2010).

#### **4. Contribución de los linfocitos B a la patogénesis del lupus.**

En el lupus se produce una desregulación de los mecanismos de tolerancia. A pesar de que la patogénesis del lupus no ha sido del todo dilucidada, existen evidencias que indican que los linfocitos B juegan un papel central, donde participan en la producción de auto-anticuerpos, en la presentación de auto-antígenos, en la producción de citoquinas y la modulación del repertorio de linfocitos T (Anolik y cols., 2004). En pacientes que desarrollan esta enfermedad se ha observado una distribución anormal de linfocitos B en comparación a controles sanos, donde los pacientes lúpicos presentan un incremento de linfocitos B vírgenes auto-reactivos (Sang y cols., 2013; Yurasov y cols., 2005). En un estudio realizado por Jacobi y cols., 2009 se destaca que los pacientes lúpicos presentan linfocitos B vírgenes y experimentados capaces de reconocer ADN de doble hebra. Más aún, incluso en pacientes en remisión se han encontrado elevados números de linfocitos B vírgenes auto-reactivos, sugiriendo que la acumulación de estas células podría agravar la patología (Yurasov y cols., 2006).

Estudios recientes han relacionado a los receptores de patrones asociados a patógenos TLR7 y TLR9 con la regulación de la tolerancia inmune. Un linfocito B auto-reactivo puede reconocer ácidos nucleicos en forma de complejos inmunes a través del BCR, internalizarlos y transportarlos al compartimento endosomal donde son reconocidos por los receptores TLR7 y TLR9, generando cascadas de señalización que culminan en la producción de auto-anticuerpos (Kono y cols., 2009; Moresco y cols., 2011).

#### **4.1. Linfocitos B de memoria en el lupus.**

Se ha descrito que en pacientes sanos existe una baja proporción de linfocitos B vírgenes capaces de reconocer auto-antígenos con baja afinidad, no obstante, estas células son normalmente excluidas del proceso de hipermutación somática en la transición hacia linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> como mecanismo de control de tolerancia (Tsuiji y cols., 2006).

Por el contrario, en el lupus la mayoría de los auto-anticuerpos son originados *de novo* en los centros germinales (CGs) a través del proceso de hipermutación somática luego de la activación y diferenciación de linfocitos B auto-reactivos. Esto refleja la ruptura de otro mecanismo de tolerancia a nivel de CGs en el lupus, donde en la condición autoinmune los linfocitos B auto-reactivos no son excluidos de los centros germinales. Esta desregulación puede llevar a la producción de nuevos linfocitos B auto-reactivos, los que contribuyen al círculo vicioso de la producción de auto-anticuerpos (Cappione y cols., 2005).

Los linfocitos T contribuyen a la patogénesis del lupus en parte favoreciendo la activación de linfocitos B auto-reactivos. Los linfocitos T foliculares (T<sub>FH</sub>) CXCR5<sup>+</sup> son

atraídos por la quimioquina CXCL13 hacia los centros germinales, donde participan en el proceso de cambio de isotipo y diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Craft, 2012). En algunos pacientes lúpicos se ha observado un incremento en el número de linfocitos  $T_{FH}$  en los CGs, lo que se correlaciona con el nivel elevado de auto-anticuerpos en la sangre, la proporción de linfocitos B en los CGs y la severidad de la enfermedad (Feng y cols., 2012). Como resultado de la reacción de los centros germinales se producen linfocitos B de memoria antígeno-específicos y células plasmáticas, cuyo aumento ha sido reportado en pacientes que desarrollan lupus (Jacobi y cols., 2003).

Aún cuando la investigación en el campo de las enfermedades autoinmunes inicialmente comenzó con la caracterización detallada de los auto-anticuerpos y de las células que los producen, queda todavía el desafío de comprender la naturaleza de la activación de los linfocitos B y de la generación de células de memoria.

En base a los antecedentes descritos anteriormente, en este trabajo propusimos caracterizar la población de linfocitos B de memoria y estudiar su contribución a la patogenicidad en un modelo murino del lupus eritematoso sistémico.



## **HIPÓTESIS**

Los ratones lúpicos presentan linfocitos B de memoria que poseen características fenotípicas propias.

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### *Objetivo General*

Caracterizar fenotípicamente los linfocitos B de memoria en un modelo murino del lupus eritematoso sistémico.

### *Objetivos específicos*

- 1) Estudiar las poblaciones de linfocitos B de memoria presentes en los diferentes órganos linfoides en ratones inmunizados.
- 2) Caracterizar los linfocitos B de memoria de acuerdo a la expresión de diferentes marcadores de superficie y a la producción de citoquinas en respuesta a la activación en ratones inmunizados.
- 3) Caracterizar los linfocitos B de memoria mediante marcadores de superficie y localización tisular en ratones que desarrollan lupus.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Ratones.

Se obtuvieron ratones hembra de la cepa (NZB x NZW) F1 como modelo del lupus murino y ratones hembra de la cepa NZW de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Se utilizaron ratones hembra (NZB x NZW) F1 de 6 meses denominados lúpicos, los cuales producen anticuerpos anti-ADN de doble hebra y presentan daño renal pues excretan proteínas en la orina en altos niveles (proteinuria de 500 mg/dL o +3 medido por Combur Test N, Roche). Se utilizaron como controles ratones hembra de la cruce de las cepas (hembra NZW x macho Balb/c) pareados por edad. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida (Santiago, Chile) en condiciones de esterilidad, con aire filtrado y comida autoclavada. Los animales se sacrificaron utilizando una dosis letal de dióxido de carbono.

### 2. Obtención de células a partir de órganos linfoides.

A partir de ratones lúpicos y controles se aislaron los siguientes órganos linfoides: bazo, ganglio mesentérico, ganglios periféricos axilares e inguinales, placas de Peyer y timo. Los bazos fueron perfundidos en 10 mL de medio RPMI+10% FCS. La suspensión celular se centrifugó a 600 x g por 7 min a 4°C y el pellet fue resuspendido en 2 mL de solución de lisis de glóbulos rojos (RBC Biolegend) e incubado por 5 minutos en hielo. Las células se lavaron con 10 mL de medio RPMI+ 10% FCS nuevamente y se resuspendieron en este mismo medio. Los órganos linfoides restantes fueron puestos en 300 µL de medio RPMI + 10% FCS y se disgregaron con tijeras. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron pasadas por una malla metálica de 90 µm y se lavaron con 4 mL de medio RPMI+10% FCS.

### 3. Citometría de flujo. Marcaje de superficie.

Por cada punto experimental se utilizó aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células, las cuales fueron incubadas por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  con Fc *block* diluido 1/400 en PBS + 2% FCS. Las moléculas de superficie de interés fueron detectadas con anticuerpos monoclonales diluidos en PBS + 2% FCS. El marcaje se realizó durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Anticuerpos monoclonales anti-ratón utilizados.

Anticuerpo anti-	Fluoróforo	Clon	Marca	Dilución
IgD	FITC	11-26c2a	BD Biosciences	1/400
CD19	FITC	6D5	Biologend	1/400
CD23	FITC	B3B4	BD Pharmingen	1/400
CD80	FITC	16-10A1	eBioscience	1/100
CD11c	PE	N418	eBioscience	1/200
IgA	PE	mA-6E1	eBioscience	1/400
CD21	PE	eBio4E3	eBioscience	1/200
PD-L2	PE	TY25	eBioscience	1/200
CD39	PE	24DM51	eBioscience	1/200
CD5	PE	53 -7.3	eBioscience	1/400
IgM	Pe Cy7	RMM-1	Biologend	1/200
CD73	Pe Cy7	EBioTY/11.8	eBioscience	1/200
CD95	Pe Cy7	Jo2	BD Biosciences	1/100
GL7	efluor 660	GL7	eBioscience	1/200
CD1d	Alexa 647	1B1	Biologend	1/400
B220	APC	RA3-6B2	Biologend	1/400
CD19	APC efluor780	eBio1D3	eBioscience	1/400
CD11c	APC efluor780	N418	eBioscience	1/200

Al término de la incubación con los anticuerpos de superficie, las células fueron lavadas con 1 mL de PBS + 2% FCS y centrifugadas a 600 x g por 7 min a 4°C. Las células se resuspendieron en PBS+2%FCS y se analizaron por citometría de flujo en un FACSCanto II (BD Biosciences). Las células muertas fueron descartadas utilizando el colorante vital yoduro de propidio a una concentración aproximada de 1 µg/10<sup>6</sup> células. El análisis de los datos de citometría se realizó utilizando el software FlowJo (Tree Star, Inc). Para los análisis estadísticos, la normalidad de los datos se comprobó mediante un test de Shapiro-Wilk y luego se ejecutaron los t-test pareados o no según el caso. En los casos donde los datos no se ajustaron a una distribución normal se utilizó un test no paramétrico (Mann-Whitney). Paralelamente se usó el software Graph Pad Prism v. 5.01 2007.

#### **4. Activación de esplenocitos y marcaje intracelular para la detección de IL-10.**

Se activaron esplenocitos de ratón a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL en medio RPMI + 10% FCS + β-mercaptoetanol 0,1% v/v (55 µM aproximadamente) con PMA (Sigma) 50 ng/mL, ionomicina (Sigma) 0,5 µg/mL, LPS de *E.coli* (Calbiochem) 10 µg/mL y monensina (BD Biosciences) 3,5 µg/mL a 37°C 5% CO<sub>2</sub> por 5 horas. Como control de la activación las células se trataron sólo con monensina 3,5 µg/mL. Transcurrido el período de incubación las células se recuperaron y se procedió con el marcaje de superficie de linfocitos B como se describió previamente. Las células se resuspendieron en 200 µL de buffer de permeabilización y fijación (Kit Cytotfix/Cytoperm, BD Bioscience) por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células se lavaron con 700 µL de buffer de permeabilización y se centrifugaron a 700 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 minutos a

4°C en oscuridad con los anticuerpos intracelulares diluidos en buffer de permeabilización. Luego las células se lavaron con 700 µL de buffer de permeabilización y se centrifugaron a 700 x g por 7 minutos a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 250 µL de PBS + 2% FCS para ser analizadas por citometría de flujo.

#### **5. Protocolo de inmunización de ratones.**

Se inmunizaron ratones Balb/c de 2 meses de edad en forma intraperitoneal con 50 µg de proteína ovoalbúmina (Grado VI, Sigma) en adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y en adyuvante incompleto de Freund en las inmunizaciones siguientes. Se realizó una inmunización semanal durante cuatro semanas. Se colectó suero inmune desde la vena de la cola tres días después de la última inmunización. Los animales se dejaron descansar durante un mes. Tres días antes de ser sacrificados se les dio una inmunización extra de 50 µg de OVA en adyuvante incompleto de Freund.

#### **6. ELISA para la detección de anticuerpos anti-OVA.**

Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano Maxisorp (Nalgene Nunc International, USA), las cuales se recubrieron con 100 ng de Ovoalbúmina disueltos en 100 µL de tampón de dilución ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,5% p/v,  $\text{NaHCO}_3$  5,6% p/v, pH 9,5) por pozo y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente la placa se lavó con PBS-Tween 0,1% y se bloqueó durante una hora con PBS-Tween 0,1% a temperatura ambiente. Luego se añadieron 100 µL de suero inmune diluido en forma seriada en PBS-Tween 0,1% desde 1/100 hasta 1/200.000 aproximadamente y se incubó por una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBS-Tween 0,1% y se

añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo secundario hecho en cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (BD Pharmingen) diluido 1/1.000 en PBS-Tween 0,1%. Luego de la incubación por una hora a temperatura ambiente en oscuridad la placa se lavó tres veces con PBS-Tween 0,1% y dos veces con agua bidestilada. Se agregaron 100  $\mu$ L por pozo de la mezcla de reacción que contiene el sustrato de la enzima peroxidasa (kit TMB Substrate reagent set, BD Biosciences) para producir el desarrollo del color. La reacción se detuvo luego de un minuto con 50  $\mu$ L de  $H_3PO_4$  1M por pozo y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro (Precision microplate reader, Molecular Devices).

#### **7. Purificación de sub-poblaciones de linfocitos B de bazo por *cell sorting*.**

Se extrajo el bazo de los ratones, se perfundió y se lisaron los glóbulos rojos como se describió anteriormente. Para cada purificación se utilizaron  $160 \times 10^6$  esplenocitos, los cuales se incubaron con 4  $\mu$ L de *Fc-block* en un volumen de 400  $\mu$ L de medio RPMI+10% FCS durante 10 minutos a 4°C en agitación. Luego se añadieron 4  $\mu$ L de los anticuerpos de superficie para seleccionar las poblaciones de interés y se incubó durante 20 minutos a 4°C en agitación y oscuridad. Las células se lavaron en 5 mL de medio RPMI+10% FCS y se resuspendieron a una concentración de aproximadamente  $30 \times 10^6$  células/mL para proceder a la separación celular. Para estudiar las sub-poblaciones de linfocitos B de los ratones inmunizados se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -IgD FITC,  $\alpha$ -IgM PeCy7 y  $\alpha$ -CD19 efluor 780 y se aislaron según el siguiente fenotipo: linfocitos B vírgenes: CD19+ IgM+ IgD+, linfocitos B de memoria IgM: CD19+IgM+IgD-, linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo: CD19+IgM-IgD-. Para estudiar los linfocitos B en el ratón lúpico se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -IgD FITC,  $\alpha$ -CD5 PE,  $\alpha$ -IgM PeCy7,  $\alpha$ -B220 APC y  $\alpha$ -CD11c efluor 780.

Los linfocitos B se purificaron descartando además las células CD11c+ y CD5+. En todos los experimentos realizados la pureza de las poblaciones obtenidas fue igual o superior al 98%.

#### **8. Cultivo y activación de sub-poblaciones de linfocitos B.**

Los linfocitos B purificados se pusieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI + 10% FCS +  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% v/v (55  $\mu$ M aproximadamente) y se agregó CpG 2  $\mu$ g/mL (CpG oligonucleotide ODN 1826, Invivogen) y  $\alpha$ -CD40 1  $\mu$ g/mL (Purified NA/LE Rat  $\alpha$ -mouse CD40 clon (3/23), BD Pharmingen) (Gallagher y cols., 2006; Cho y cols., 2013). Las células se cultivaron por 48 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### **9. Detección de citoquinas mediante CBA (Cytometric Bead Array).**

La detección de citoquinas en los sobrenadantes de la activación de linfocitos B se realizó utilizando el kit CBA (Cytometric Bead Array) inflamatorio de ratón, el cual permite medir simultáneamente las citoquinas IL-12p70, TNF, IL-6, IL-10, MCP-1 e IFN- $\gamma$ . Para esto se incubaron 11  $\mu$ L de sobrenadante con 11  $\mu$ L de una mezcla de las perlas específicas para cada citoquina y 11  $\mu$ L del reactivo de detección en PE por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las muestras se lavaron con 300  $\mu$ L de una solución de lavado provista por el kit y las muestras se centrifugaron a 250 x g por 5 minutos a 4 °C. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de la solución de lavado y se analizaron por citometría de flujo. Los datos obtenidos se analizaron con el programa BD CBA Software.

## RESULTADOS

El objetivo de este proyecto es estudiar los linfocitos B de memoria durante el desarrollo del lupus, pero se desconoce aún la identidad de estos linfocitos en ratones. Por lo tanto, en primer lugar utilizamos ratones inmunizados con un antígeno proteico para identificar esta sub-población de linfocitos B en ratones.

### **1. Análisis en diferentes órganos linfoides de las poblaciones de linfocitos B de memoria en ratones inmunizados.**

Como primera aproximación para el estudio de los linfocitos B de memoria se utilizaron ratones Balb/c de 2 meses de edad, los cuales fueron inmunizados en forma intraperitoneal con 50 µg de Ovoalbúmina (OVA) en adyuvante completo de Freund y luego una vez por semana durante tres semanas se repitieron las inmunizaciones con OVA en adyuvante incompleto de Freund. Tres días posteriores a la tercera y cuarta inmunización se obtuvo suero inmune y se evaluó el título de anticuerpos anti-OVA mediante un ensayo de ELISA. La Figura 2 muestra que los ratones inmunizados presentan un alto nivel de anticuerpos anti-OVA comparado a ratones no inmunizados, además el nivel de anticuerpos se incrementa desde la tercera a la cuarta inmunización. Un protocolo exitoso de inmunización es el utilizado para producir anticuerpos monoclonales, por lo tanto un mes después de la última inmunización los ratones recibieron una dosis de OVA en adyuvante incompleto de Freund y tres días más tarde los ratones fueron sacrificados y se analizaron las sub-poblaciones de linfocitos B en diferentes órganos linfoides. Además de estudiar el bazo como órgano linfoide secundario principal y los ganglios periféricos, se analizó el ganglio mesentérico y las placas de Peyer debido a que en estos órganos se desarrollan en forma importante las respuestas de memoria (Weinstein y cols., 1991). También se

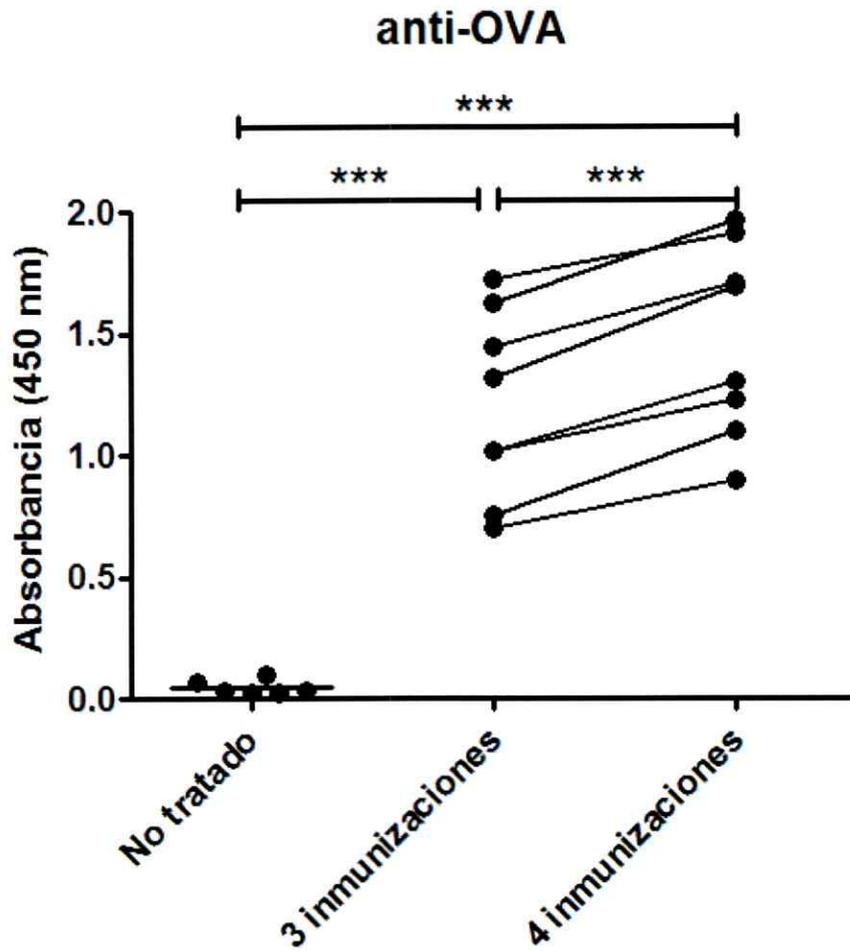
estudió el timo dado que en condiciones de inflamación los linfocitos B pueden migrar a este órgano (Hodge y cols., 2012). En primer lugar se analizó el porcentaje y número absoluto de linfocitos B totales CD19+CD11c- en los órganos linfoides mencionados (Figura 3). En el bazo aproximadamente el 40% de las células corresponden a linfocitos B y en las placas de Peyer se encuentra el mayor porcentaje de linfocitos B (55%-60%). Al comparar los órganos de los ratones inmunizados versus los controles no tratados sólo se encontraron diferencias significativas en el timo, donde se observó un incremento en el porcentaje y número absoluto de linfocitos B desde un 0,3% a un 10% en promedio.

A continuación se analizaron distintas sub-poblaciones dentro de los linfocitos B CD19+CD11c-. Se ha descrito que los linfocitos B luego de activarse forman estructuras denominadas centros germinales y que las células de memoria se originan producto de la reacción que allí ocurre (Oropallo y cols., 2014). Los linfocitos B de los centros germinales expresan el marcador GL7 y las células de memoria luego de formarse salen de estas estructuras y pierden la expresión de esta molécula (Taylor y cols., 2012). Por lo tanto, el análisis de los linfocitos B de memoria se realizó dentro de una ventana de eventos GL7 negativos, según la estrategia definida en la Figura 4A.

De acuerdo a la expresión de las inmunoglobulinas IgM e IgD podemos definir tres sub-poblaciones de linfocitos B: las células vírgenes, las cuales expresan ambas moléculas (IgM+IgD+), las células de memoria clásicas que han realizado el cambio de isotipo desde IgM hacia otros subtipos de inmunoglobulinas (IgM-IgD-), y las células de memoria que no han sufrido el proceso de cambio de clase y mantienen el isotipo IgM (IgM+IgD-), las cuales han sido descritas en la literatura recientemente (Pape y cols., 2012) (Figura 4A). Al analizar estas tres sub-poblaciones se encontraron diferencias

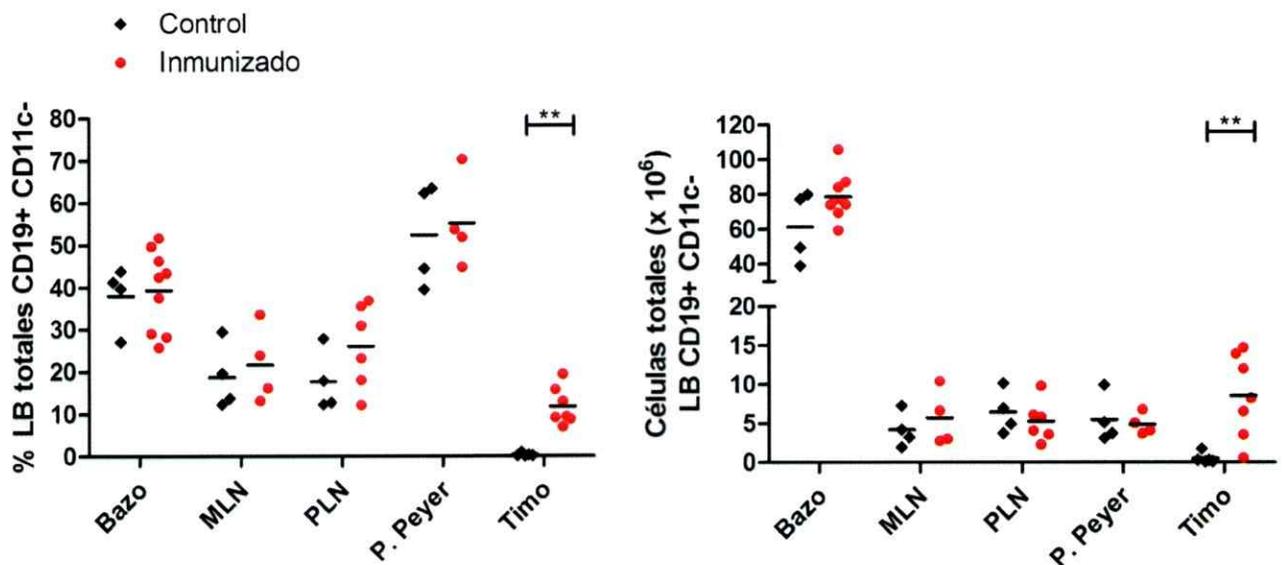
significativas solamente en el timo (Figura 4B, 4C). El porcentaje de la población de linfocitos B de memoria clásicos y el de las células de memoria IgM<sup>+</sup> disminuyó significativamente en el timo de ratones inmunizados, mientras que el porcentaje de linfocitos B vírgenes IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> aumentó en el mismo órgano en comparación a ratones controles no tratados.

Dentro de los órganos linfoides secundarios estudiados, el porcentaje más alto de linfocitos B de memoria clásicos (IgM-IgD<sup>-</sup>) se encontró en las placas de Peyer (8% a un 12% aprox.), mientras que el porcentaje más alto de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> se encontró en el bazo (15% aprox.) (Figura 4B, 4C). En cuanto a los números absolutos de estas dos poblaciones de memoria, la mayor cantidad de estas células se encontró en el bazo de los ratones inmunizados y se observó una tendencia al aumento en el caso de los linfocitos B de memoria clásicos (Figura 4C). Por esta razón se continuó con el estudio y caracterización de las poblaciones de linfocitos B de memoria a partir de células obtenidas de este órgano en los experimentos posteriores.



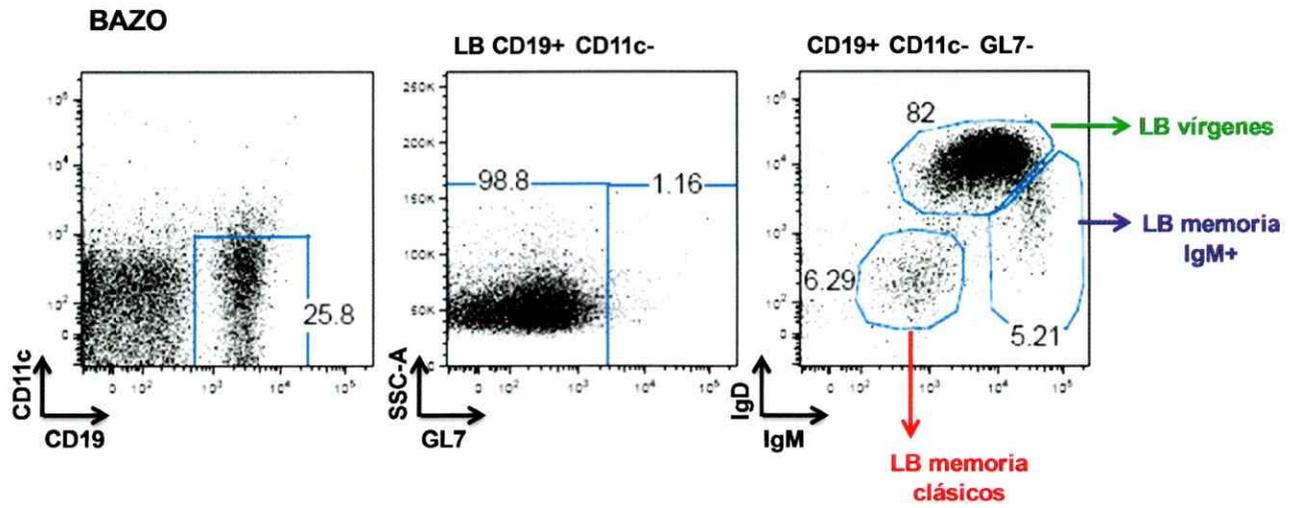
**Figura 2. Producción de anticuerpos anti-ovoalbúmina en el suero de ratones inmunizados.** Se inmunizaron ratones Balb/c intraperitonealmente con 50 µg de proteína ovoalbúmina/Adjuvante de Freund durante 4 semanas. Tres días después de la última inmunización se obtuvo suero inmune y se analizó por ELISA. Se muestra la absorbancia medida a 450 nm para la dilución 1/200. Los datos mostrados luego de la tercera y cuarta inmunización son pareados para el mismo ratón (n = 8). El análisis estadístico se realizó mediante un t-test pareado para comparar los grupos de datos de la tercera y cuarta inmunización, cuya distribución normal se comprobó previamente mediante una prueba de Shapiro-Wilk. Para comparar el resto se realizó un test no pareado (Mann-Whitney).  
 \* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\* p < 0,0001.

### Linfocitos B totales

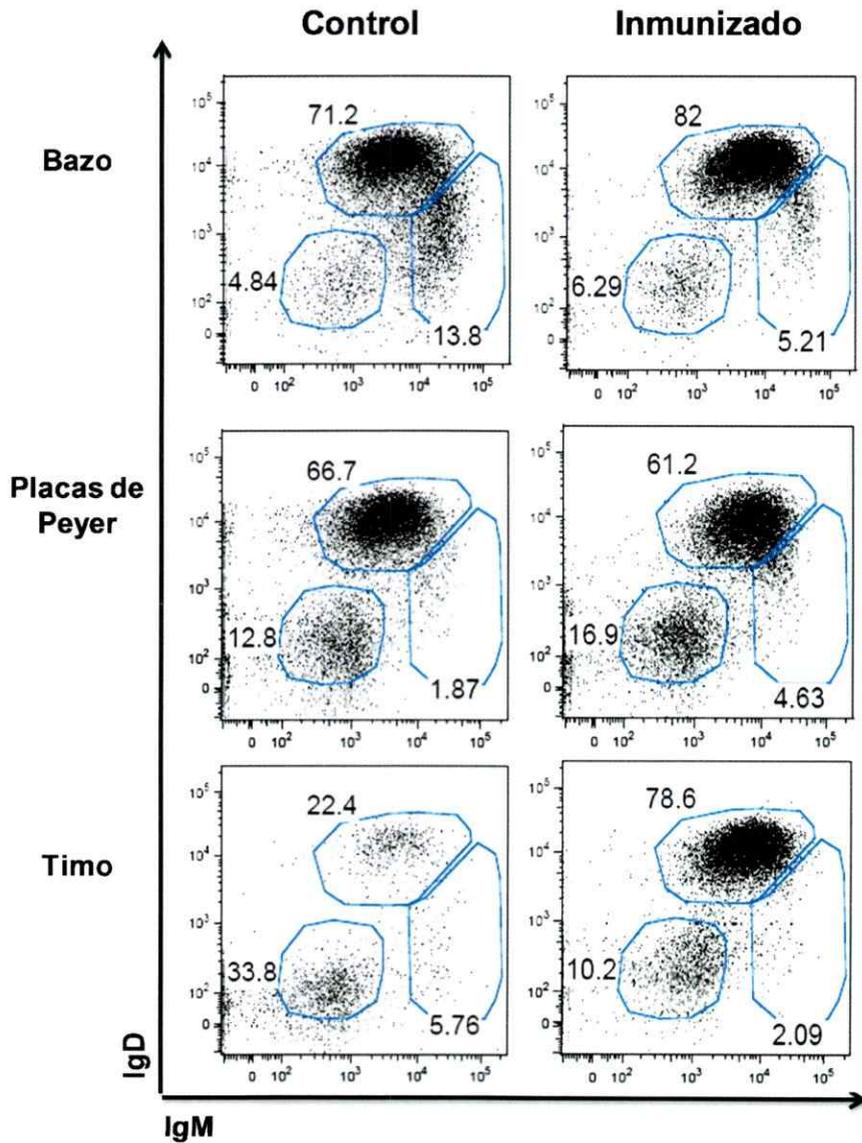


**Figura 3. Los ratones inmunizados presentan un aumento en el porcentaje y número absoluto de linfocitos B totales en el timo.** Análisis del porcentaje y número absoluto de linfocitos B CD19+CD11c- en bazo, ganglio mesentérico (MLN), ganglios periféricos (PLN), placas de Peyer y timo de ratones Balb/c inmunizados con OVA/Adyuvante de Freund en comparación a ratones controles no tratados. Cada punto representa el órgano estudiado en un ratón. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). \* p< 0,05. \*\* p< 0,001.

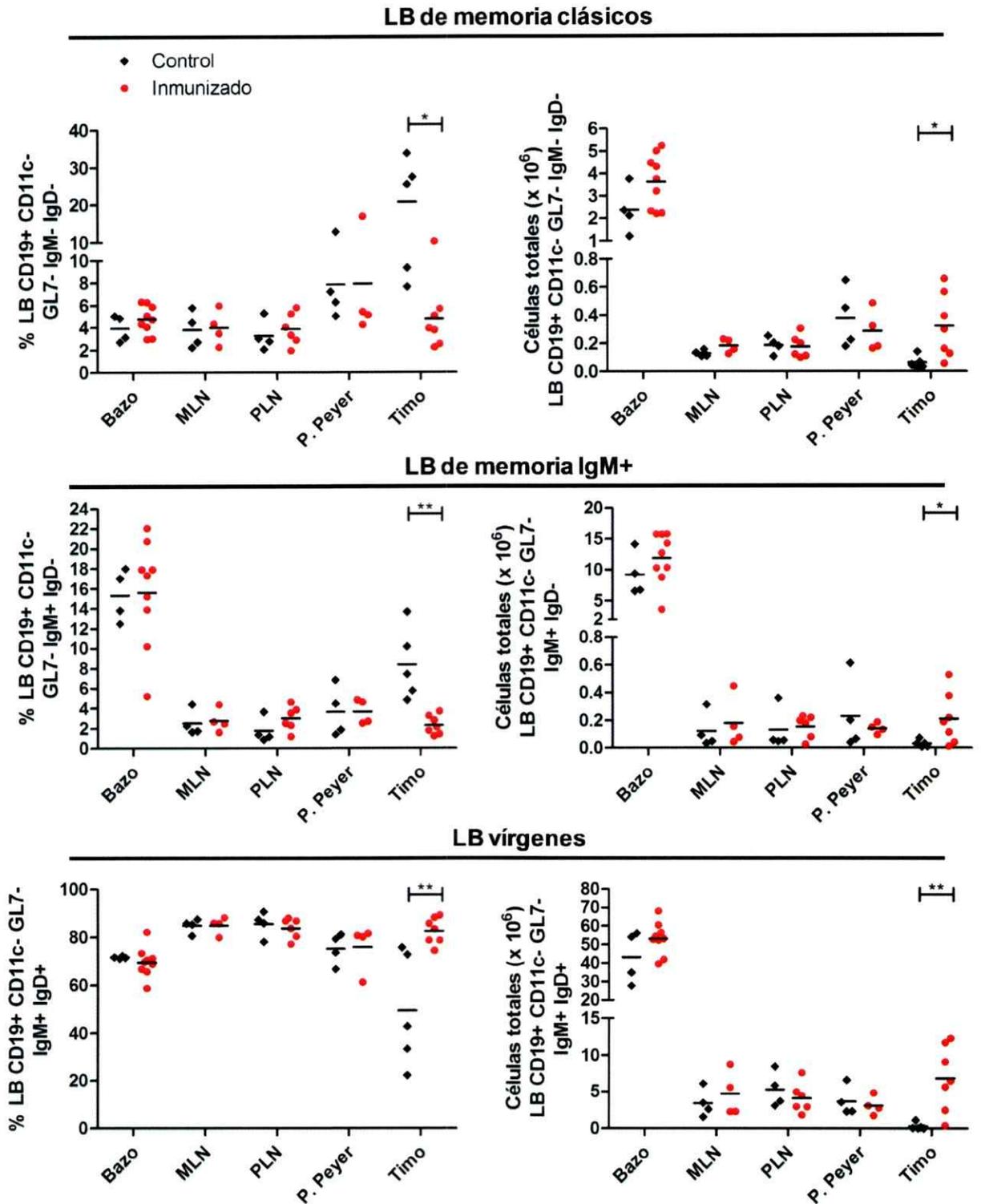
**A**



**B**



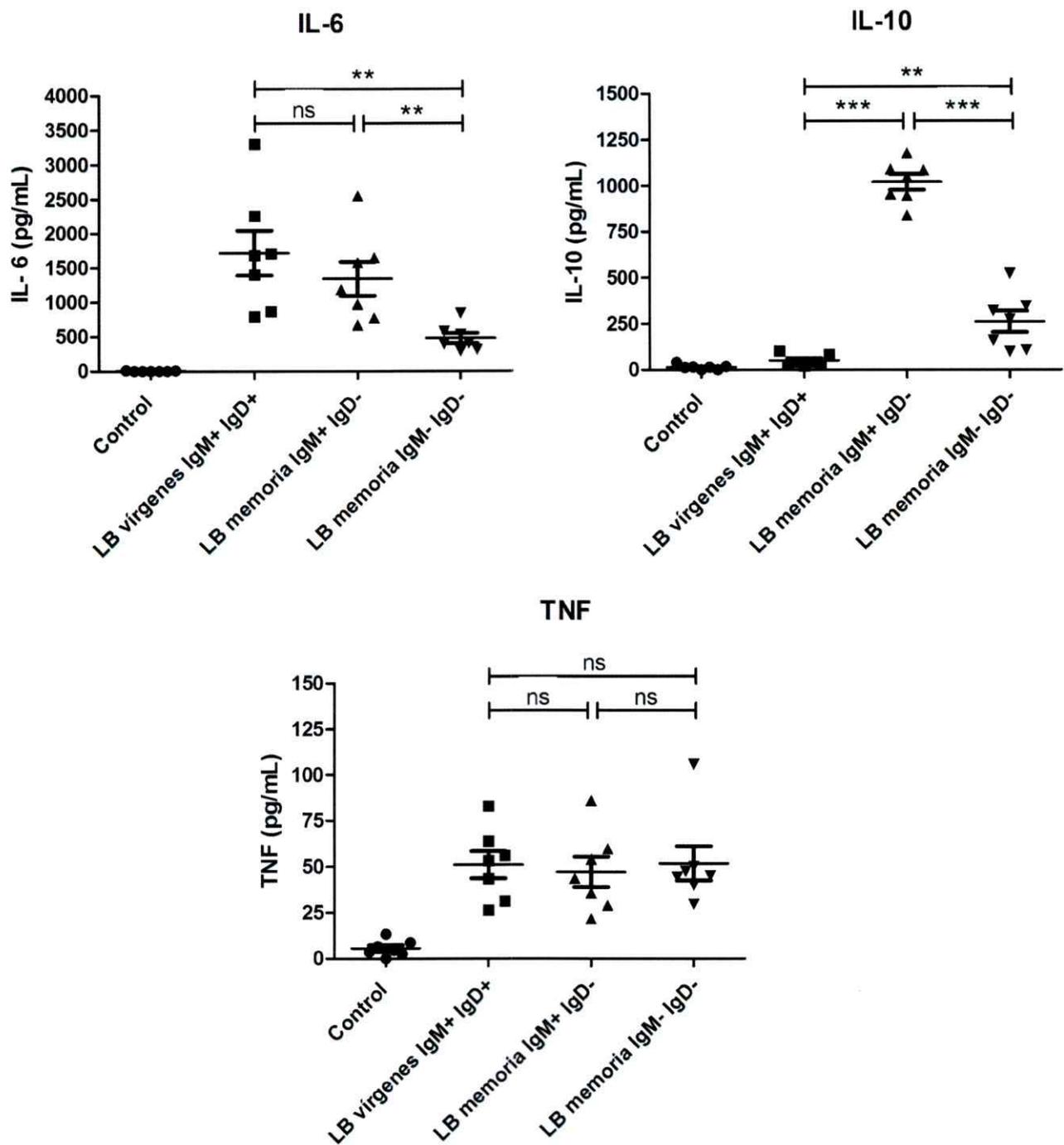
C



**Figura 4. Subpoblaciones de linfocitos B en diferentes órganos en ratones inmunizados.** A) Estrategia de análisis mediante citometría de flujo de linfocitos B dentro de la población CD19+CD11c-GL7-: linfocitos B vírgenes (IgM+IgD+), linfocitos B de memoria IgM (IgM+IgD-) y linfocitos B de memoria clásicos (IgM-IgD-). B) Análisis representativo de IgM e IgD en bazo, placas de Peyer y timo de ratones inmunizados y controles. C) Cuantificación del porcentaje y número absoluto de las sub-poblaciones mencionadas. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). \* p < 0,05. \*\* p < 0,001.

## **2. Los linfocitos B de memoria activados *in vitro* producen IL-10, IL-6 y TNF.**

Las diferentes sub-poblaciones de linfocitos B presentes en el bazo de ratones inmunizados con ovoalbúmina fueron aisladas por *cell sorting* y activadas por 48 horas con CpG y anti-CD40. Transcurrido este período se colectó el sobrenadante de los cultivos y se analizó mediante citometría de flujo la presencia de IL-12p70, MCP-1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 y TNF, sin embargo sólo se detectó la presencia de las tres últimas citoquinas (Figura 5). En particular observamos que los linfocitos B vírgenes al ser activados producen altos niveles de IL-6 y no producen IL-10. Los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> son los principales productores de IL-10 y producen IL-6 en altos niveles. Por último, los linfocitos B de memoria clásicos producen IL-6 en bajos niveles e IL-10 en un nivel inferior a las células de memoria IgM<sup>+</sup>. La citoquina TNF fue producida en bajas concentraciones en comparación a IL-6 e IL-10 y no se observaron diferencias significativas entre las sub-poblaciones de linfocitos B. Los linfocitos B vírgenes en la condición control no tratados no produjeron citoquinas.



**Figura 5.** Los linfocitos B de memoria activados *in vitro* producen las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF. Las sub-poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria IgM+ y de memoria clásicos fueron purificadas por *cell sorting* a partir del bazo de ratones inmunizados con proteína ovoalbúmina. Las células se activaron con CpG 2 µg/mL y α-CD40 1 µg/mL por 48 horas y el sobrenadante se analizó mediante citometría de flujo. Como control se muestra el sobrenadante de linfocitos B vírgenes no tratados. La línea horizontal y la barra perpendicular indican el promedio y el error estándar, respectivamente. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). ns: no significativo. \* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\* p < 0,001.

### **3. Los linfocitos B de memoria activados *in vitro* expresan marcadores de centros germinales y se diferencian a células pre-plasmáticas.**

Luego de la activación de las sub-poblaciones de linfocitos B con CpG y anti-CD40 por 48 horas se analizó el fenotipo de las células mediante citometría de flujo. En primer lugar se examinó la expresión de las inmunoglobulinas IgM e IgD (Figura 6). Se observó que los linfocitos B vírgenes presentan menor expresión tanto de IgM como IgD pero siguen siendo dobles positivos. Por otro lado, ambas sub-poblaciones de memoria mantuvieron su fenotipo inicial.

Los linfocitos B luego de activarse forman estructuras llamadas centros germinales (Zaheen y cols., 2009) y adquieren la expresión de los marcadores GL7 y CD95. Al analizar el porcentaje de células GL7+CD95+ se encontró que los linfocitos B vírgenes poseen una mayor tendencia a formar centros germinales en comparación a los linfocitos B de memoria (Figura 6).

Las células encargadas de la producción de anticuerpos son las células plasmáticas, las cuales poseen un fenotipo CD19-CD138+ (Sears y cols., 2014). Al analizar estas moléculas se encontró que ambas sub-poblaciones de linfocitos B de memoria luego de ser activados poseen una mayor expresión de CD138 en comparación a los linfocitos B vírgenes (25% versus un 16%, respectivamente) (Figura 6), sin embargo mantuvieron la expresión de CD19.

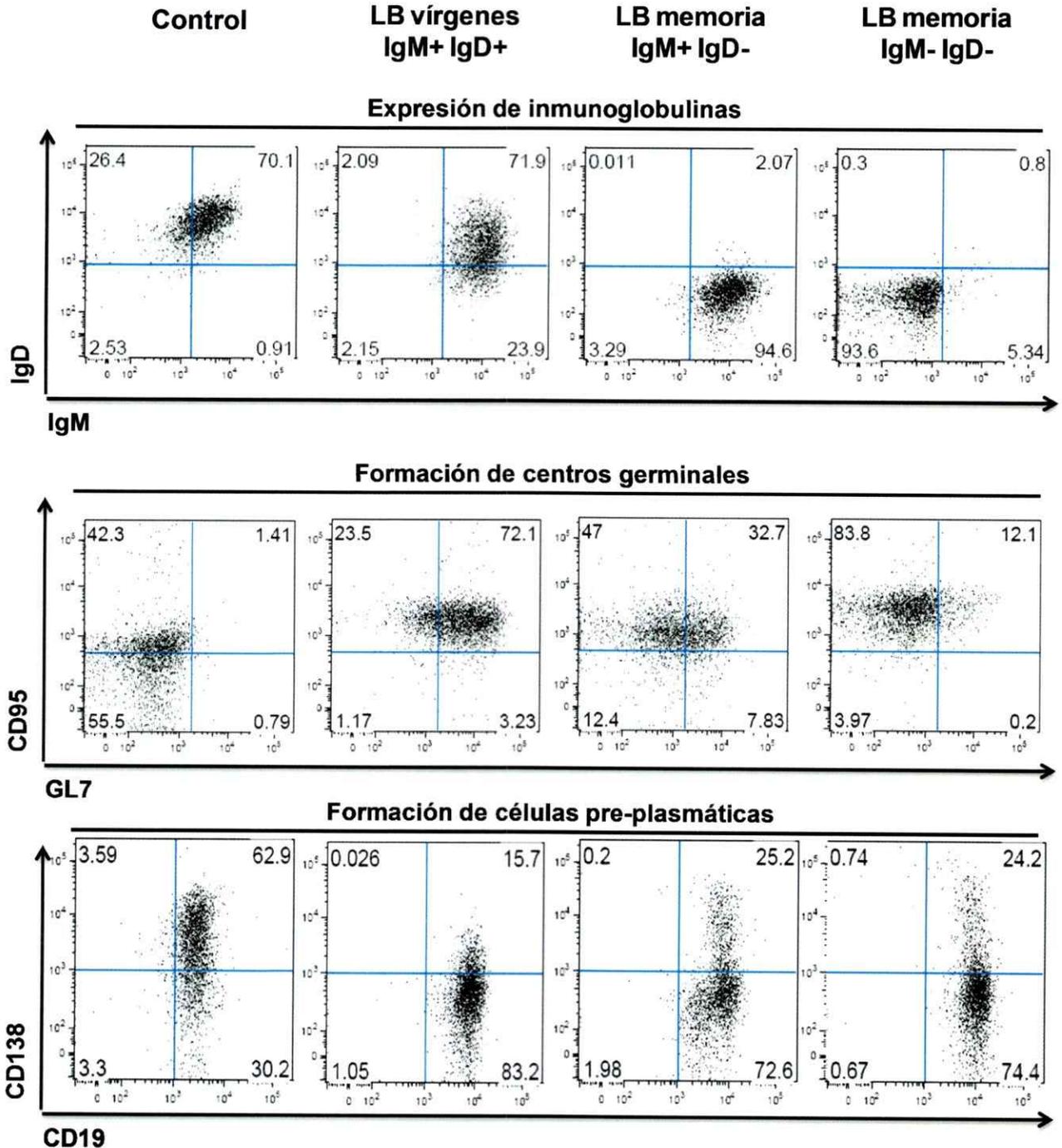
#### **4. Los linfocitos B de memoria clásicos activados *in vitro* expresan moléculas de coestimulación y los marcadores CD80, CD73 y PD-L2.**

Al analizar la expresión de distintos marcadores de activación se encontró que los linfocitos B de memoria clásicos expresaron los niveles más altos de CD86, CD83, MHC-II y CD69 en comparación a las otras sub-poblaciones estudiadas. Los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> expresaron estas moléculas con una intensidad inferior a la de los linfocitos B vírgenes IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> (Figura 7).

Recientemente en la literatura se han descrito como marcadores de linfocitos B de memoria a las moléculas CD80, CD73 y PD-L2 (Weill y cols., 2013), cuya expresión también fue analizada en las distintas sub-poblaciones activadas. Se encontró que la sub-población de linfocitos B de memoria clásicos expresa con mayor intensidad estos tres marcadores en comparación a los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> y a los linfocitos B vírgenes (Figura 7A).

CD73 y CD39 son moléculas que han sido descritas principalmente en linfocitos T (Antonioli y cols., 2013), sin embargo, existe un reporte que las declara necesarias para el proceso de cambio de clase de inmunoglobulina en los linfocitos B (Schena y cols., 2013). Al analizar la expresión de CD39 y CD73 se encontró un mayor porcentaje de células CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> dentro de la sub-población de linfocitos B de memoria clásicos IgM-IgD<sup>-</sup> (Figura 7B).

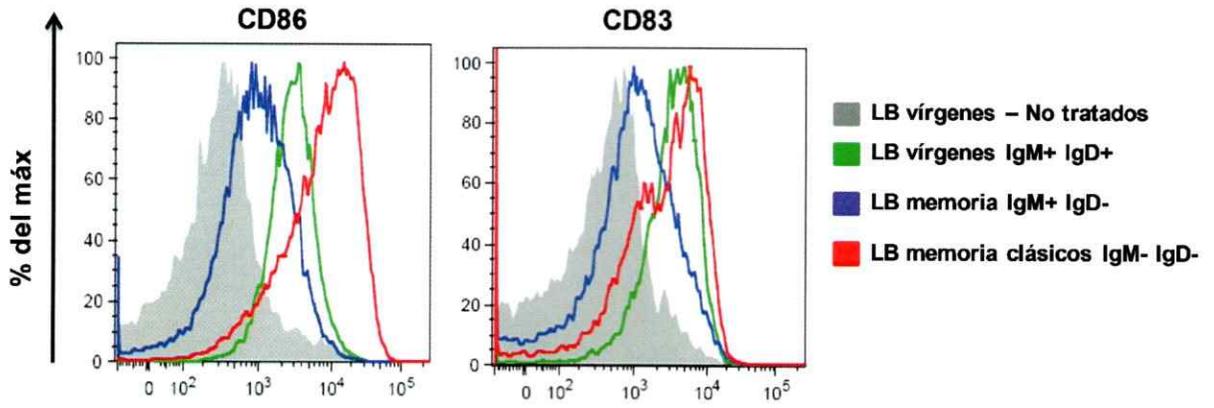
En la Tabla III se muestra un resumen de la expresión de los marcadores descritos para las sub-poblaciones de linfocitos B mencionadas.



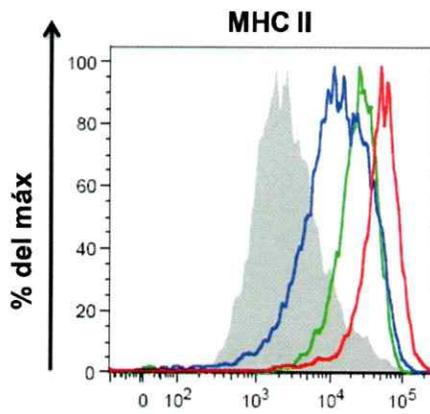
**Figura 6. Los linfocitos B de memoria al activarse expresan marcadores de centros germinales y se diferencian a células pre-plasmáticas.** Fenotipo de las sub-poblaciones de linfocitos B luego de ser purificadas por *cell sorting* y activadas por 48 horas con CpG 2 µg/mL y α-CD40 1 µg/mL. Análisis de la expresión de inmunoglobulinas IgM e IgD, fenotipo de linfocitos B de centros germinales GL7+CD95+ y de la expresión de marcadores de células plasmáticas para cada sub-población dentro de una ventana de células CD19+. Resultados representativos de n = 2 experimentos.

**A**

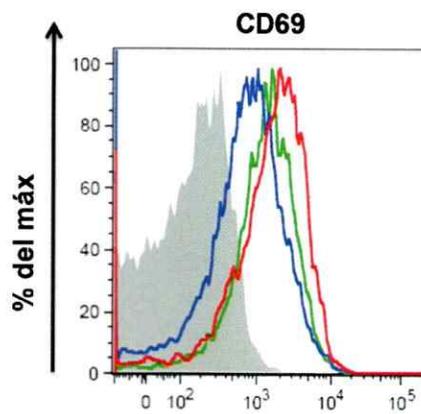
**Marcadores de co-estimulación**



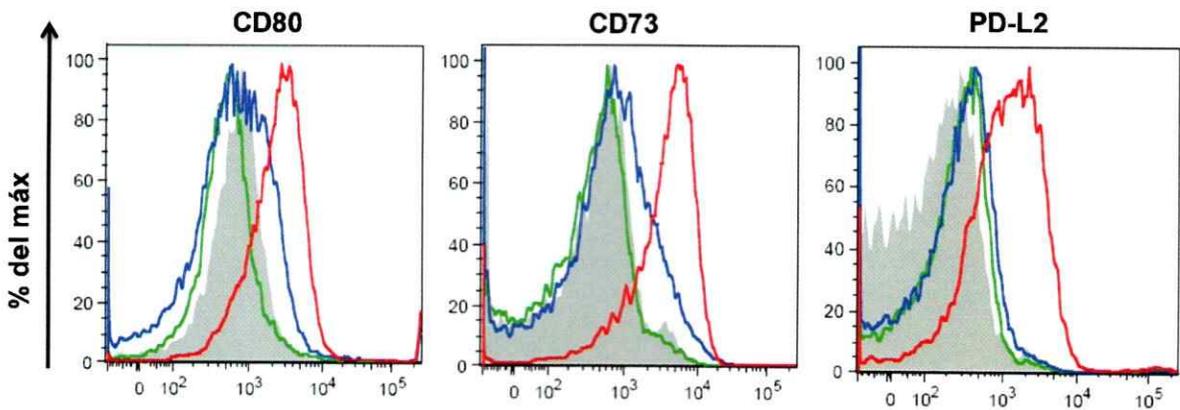
**Presentación de antígeno**

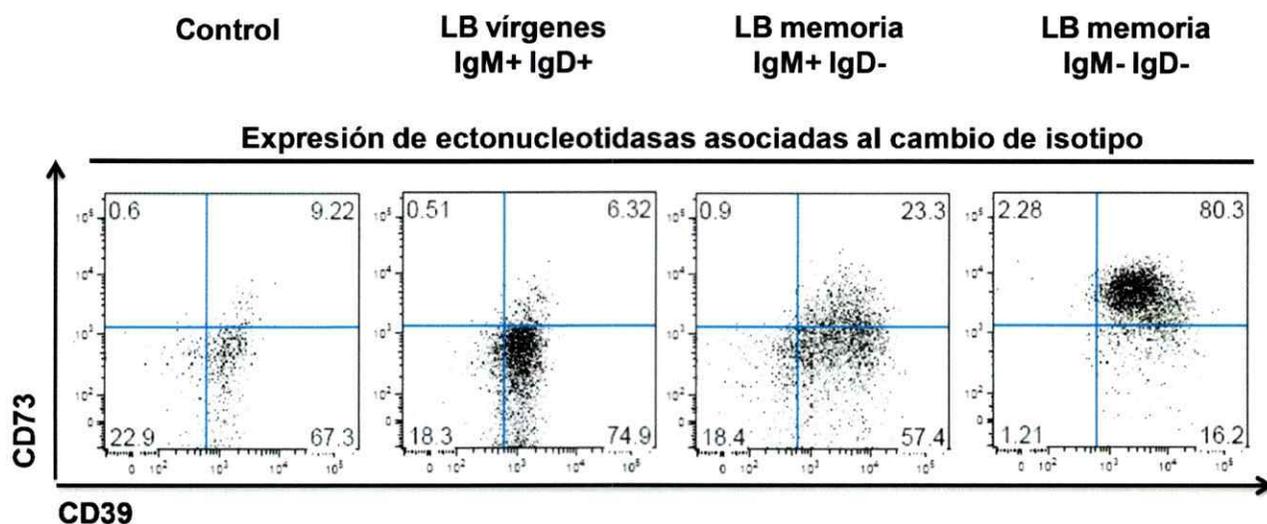


**Activación temprana**



**Memoria inmunológica**



**B**

**Figura 7.** Los linfocitos B que han hecho el cambio de isotipo CD19<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> al activarse expresan moléculas de coestimulación y los marcadores de memoria CD80, PD-L2 y CD73. Fenotipo de las subpoblaciones de linfocitos B luego de ser purificadas por *cell sorting* y activadas por 48 horas con CpG 2 µg/mL y α-CD40 1 µg/mL analizado por citometría de flujo. A) Histogramas de la expresión de moléculas de coestimulación, marcadores de activación y de memoria para cada sub-población dentro de una ventana de células CD19<sup>+</sup> (resultado representativo de n = 3 experimentos). B) Gráfico de puntos de la expresión de CD39 y CD73 dentro de una ventana de células CD19<sup>+</sup> para cada sub-población (resultado representativo de n = 2 experimentos).

Tabla III. Características principales de los linfocitos B de ratones inmunizados y activados *in vitro* (\*).

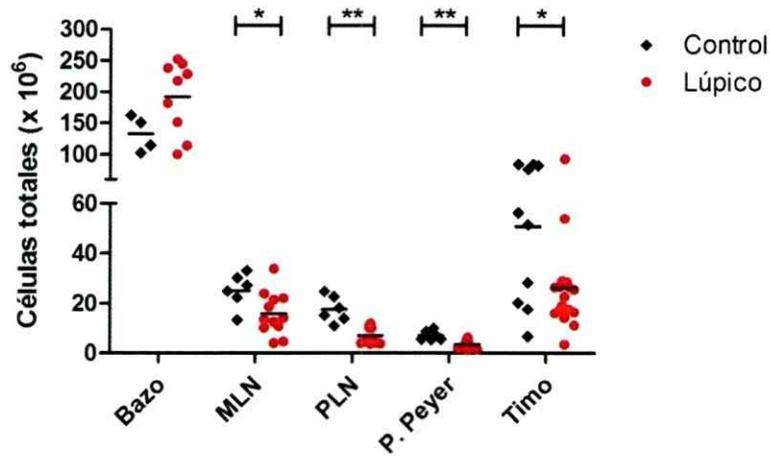
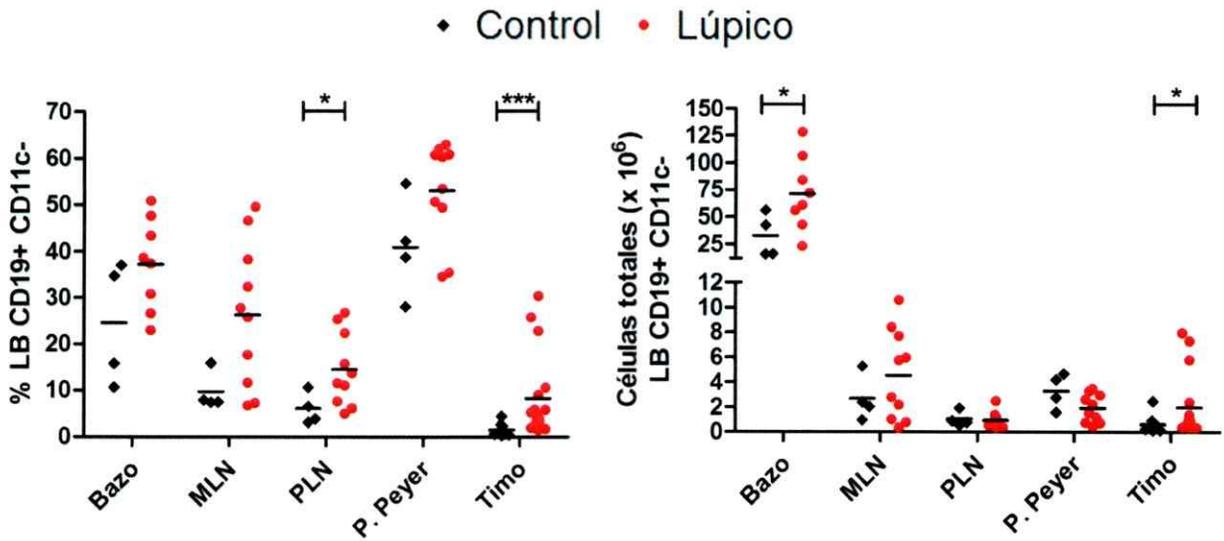
	Linfocitos B vírgenes IgM+IgD+	Linfocitos B memoria IgM+IgD-	Linfocitos B memoria clásicos IgM-IgD-
% LB con fenotipo IgM/IgD inicial	71,9%	94,6%	93,6%
% LB de centros germinales GL7+CD95+	72,1%	32,7%	12,1%
% Diferenciación a células pre-plasmáticas CD138+CD19+	15,7%	25,2%	24,2%
Expresión de CD86	++	+	+++
CD83	++	+	++
Iad-MHC-II	++	+	+++
CD69	++	+	++
CD80	-	+	++
CD73	-	+	++
PD-L2	-	-	++
% LB CD80+CD73+	3,6%	16,8%	74,5%
% LB PD-L2+CD73+	2,2%	5,7%	55%
% LB CD39+CD73+	6,3%	23,3%	80,3%
Producción de IL-6	++	++	+
IL-10	-	+++	++
TNF	+	+	+

(\*) Activación de linfocitos B con CpG y anti-CD40.

## **5. Análisis de las sub-poblaciones de linfocitos B en ratones lúpicos y controles.**

Para estudiar los linfocitos B de memoria en el lupus se utilizaron ratones hembras de la cepa [NZBW] F1 de seis meses de edad que presentan elevados niveles de auto-anticuerpos anti-ADN de doble hebra y daño renal, el cual fue medido a través de la presencia de proteínas en la orina (500 mg/dL). Como cepa control en todos los experimentos se utilizaron ratones hembra NZW x Balb/c pareados por edad.

A partir de ratones lúpicos y controles se obtuvieron suspensiones celulares de los siguientes órganos linfoides secundarios: bazo, ganglio mesentérico (MLN), ganglios periféricos (PLN) placas de Peyer y timo. Al comparar el número de células totales por órgano se encontró que los ratones lúpicos poseen una tendencia a la esplenomegalia, sin embargo el número de células disminuyó en los órganos restantes en comparación a los ratones controles (Figura 8A). Al analizar el porcentaje de linfocitos B totales CD19+CD11c- se observó una tendencia al aumento en los órganos linfoides de los ratones lúpicos con una diferencia significativa en los ganglios periféricos y en timo (Figura 8B). Respecto al número absoluto, esta tendencia al aumento de linfocitos B se vio reflejada en el bazo de los ratones lúpicos en comparación a los ratones controles (Figura 8B).

**A****B**

**Figura 8.** Los ratones lúpico presentan un aumento de linfocitos B totales en los órganos linfoides comparado a ratones controles. A) Gráfico del número absoluto de células vivas para cada órgano. B) Gráfico del porcentaje y número absoluto de linfocitos B en cada órgano. Los datos del timo se obtuvieron de Fuentes C, 2014. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney).

\* p < 0,05. \*\* p < 0,001.

**6. Los ratones lúpicos presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos IgM- IgD- en los órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles.**

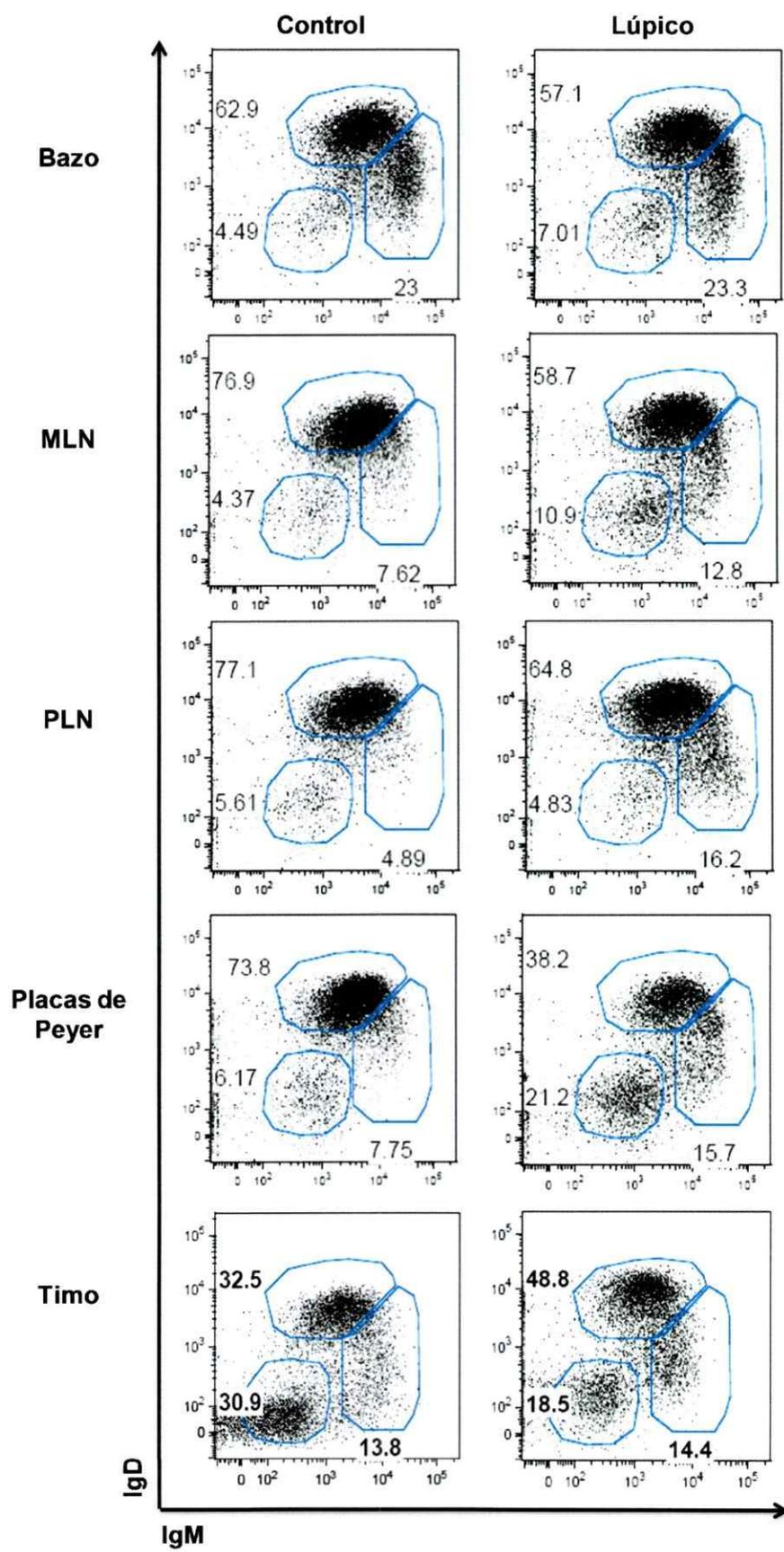
Para analizar las poblaciones de linfocitos B de memoria se utilizó la estrategia ejemplificada en la Figura 4A. Dentro de la población de linfocitos B totales CD19+CD11c- se seleccionaron las células GL7-, puesto que los linfocitos B de memoria una vez formados abandonan los centros germinales y pierden la expresión de este marcador (Taylor y cols., 2012).

Al comparar las distintas sub-poblaciones de linfocitos B se encontró un aumento significativo del porcentaje y número absoluto de linfocitos B de memoria clásicos en el bazo de ratones lúpicos (Figura 9A y 9B) y se observó una tendencia al aumento del porcentaje de esta población en el ganglio mesentérico y en placas de Peyer, mientras que en el timo disminuyeron en comparación a ratones controles. Respecto de la población de linfocitos B de memoria que mantiene el isotipo IgM se encontró una tendencia al aumento del porcentaje en ganglio mesentérico, ganglios periféricos, placas de Peyer y timo y una tendencia a la disminución en el bazo de ratones lúpicos (Figura 9B). Al analizar los linfocitos B vírgenes hallamos una tendencia a la disminución en el porcentaje de esta población en ratones lúpicos, con diferencias significativas en ganglio mesentérico y placas de Peyer y un aumento significativo en el timo (Figura 9B).

Los anticuerpos de isotipo IgA poseen un papel importante en la mantención de la tolerancia intestinal (Jacob y cols., 2008) se estudiaron los linfocitos B de memoria IgA+, siguiendo una estrategia de análisis similar (Figura 10A). Se observó una tendencia al aumento del porcentaje de linfocitos B de memoria IgA+ IgM- en el ganglio

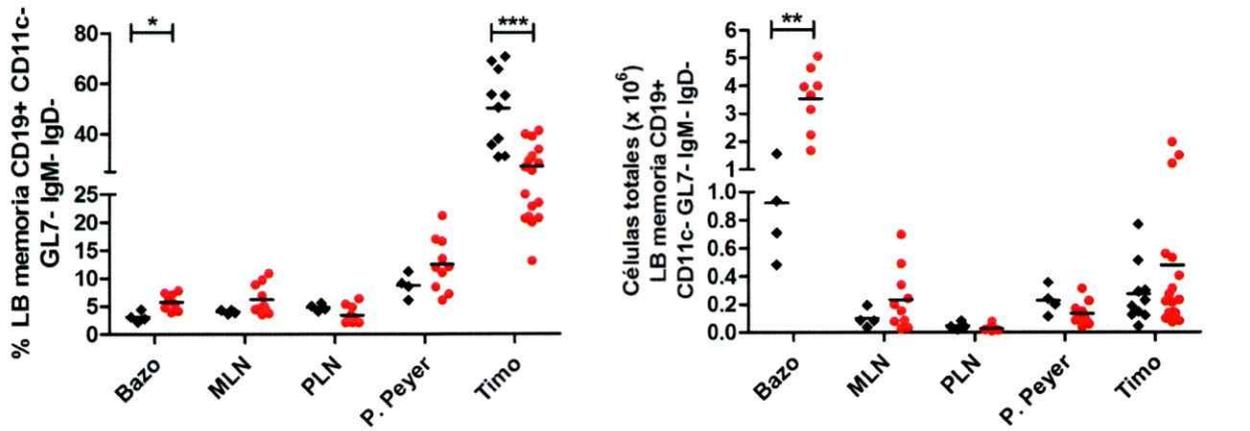
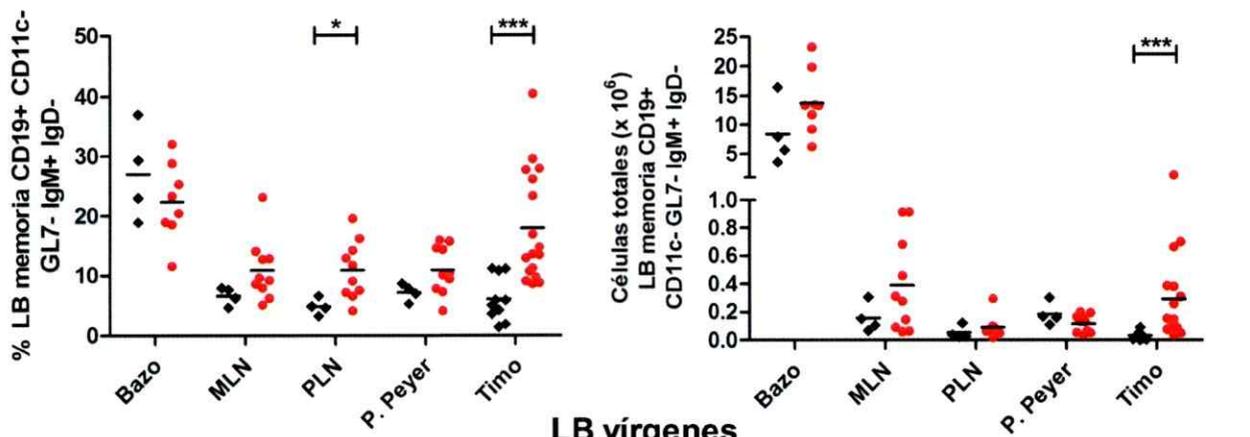
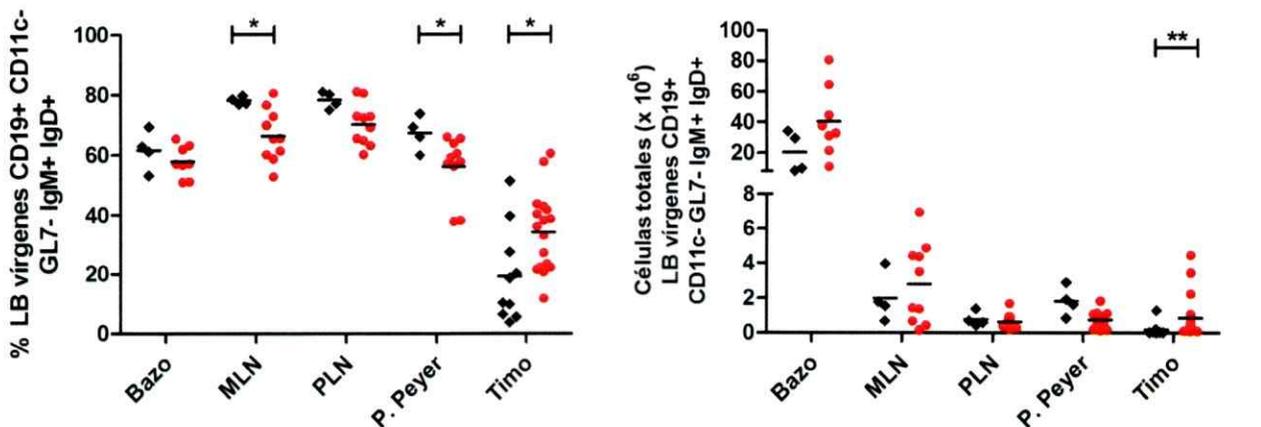
mesentérico y en placas de Peyer de ratones lúpicos en comparación a controles. Esta población se vio disminuida significativamente en números absolutos en las placas de Peyer de ratones lúpicos (Figura 10B, 10C).

**A**



**B**

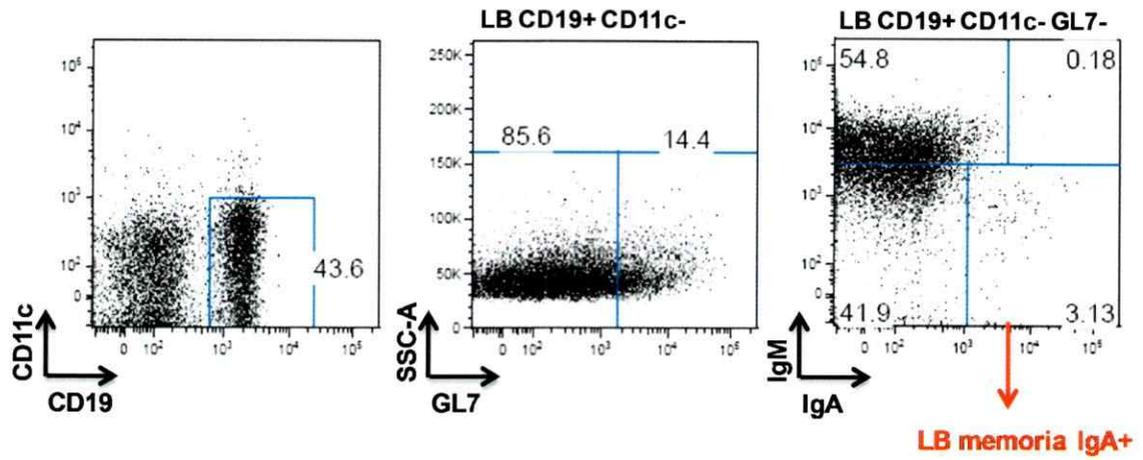
♦ Control • Lúpico

**LB de memoria clásicos****LB de memoria IgM+****LB vírgenes**

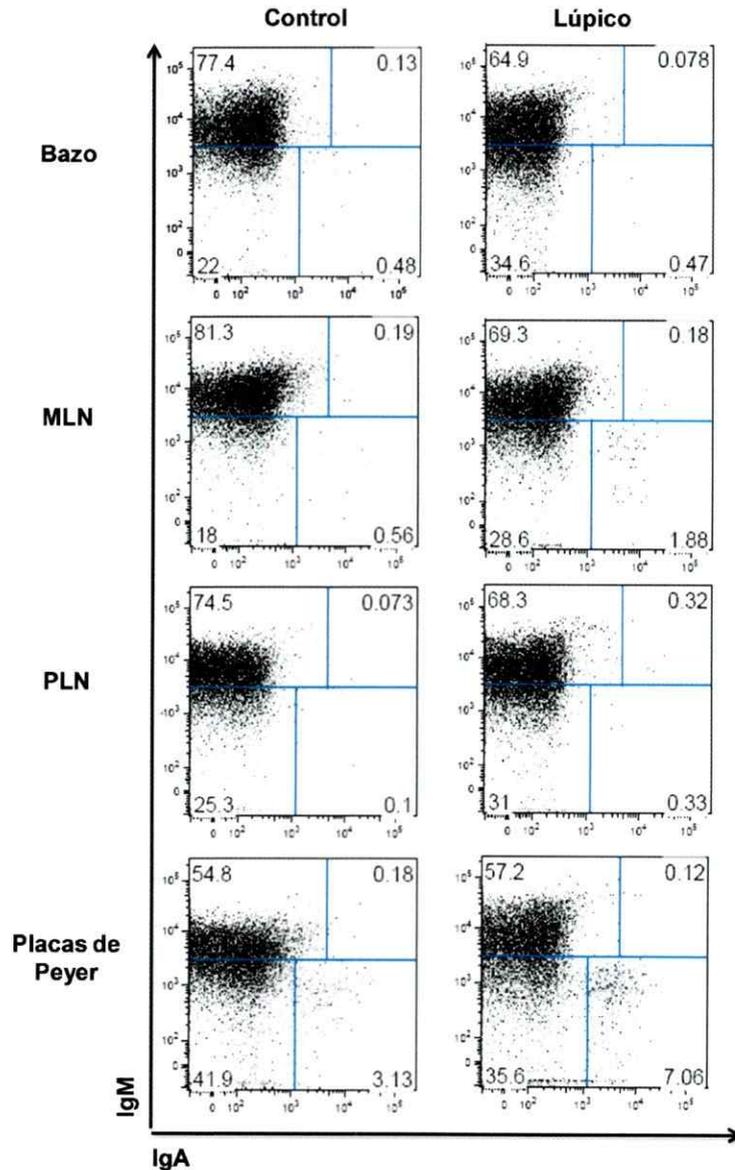
**Figura 9. Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos en los órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles.** A) Análisis representativo de linfocitos B de memoria y vírgenes en los órganos linfoides de ratones controles y lúpicos dentro de una ventana de eventos CD19+CD11c-GL7-. B) Porcentaje y números absolutos de las sub-poblaciones de linfocitos B. Los datos del timo se obtuvieron de Fuentes C, 2014. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney) y los datos con distribución normal (Shapiro-Wilk) se analizaron mediante un t-test no pareado. \* p < 0,05. \*\* p < 0,001.

**A**

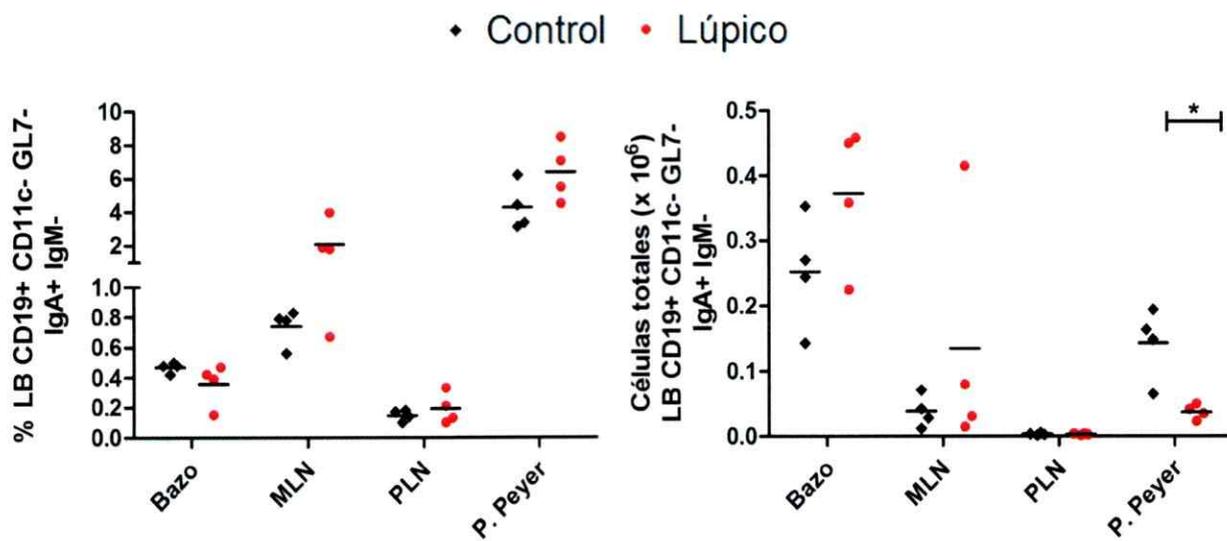
**Placas de Peyer ratón control**



**B**



C



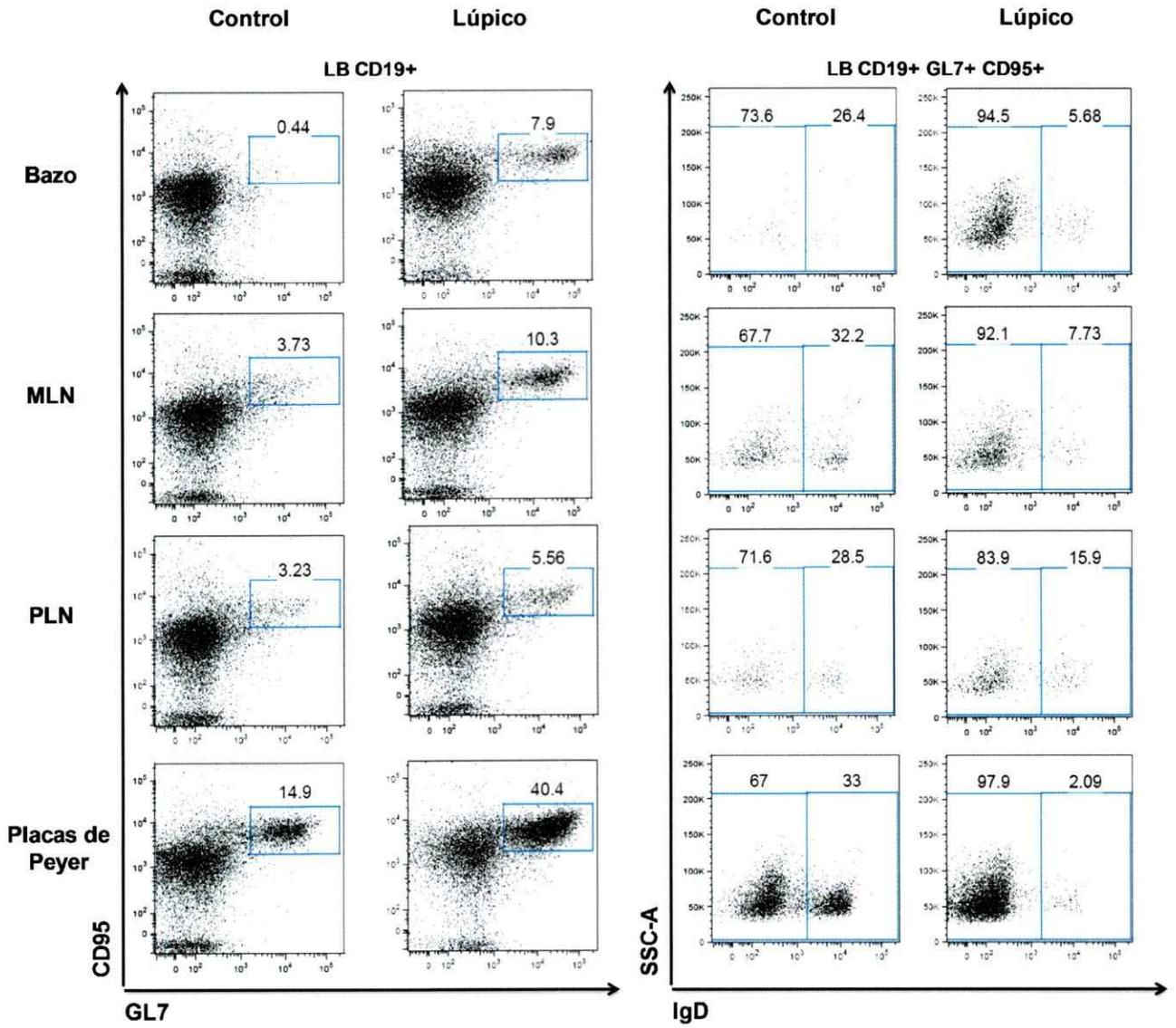
**Figura 10. Los ratones lúpicos presentan linfocitos B de memoria IgA+ en ganglio mesentérico y placas de Peyer.** A) Estrategia de análisis mediante citometría de flujo ejemplificada en placas de Peyer de ratón control. Los LB de memoria IgA+ se analizaron dentro de la población de linfocitos B CD19+CD11c-GL7-. B) Análisis representativo de las células IgA+ en bazo, ganglio mesentérico (MLN), ganglios periféricos (PLN) y placas de Peyer en ratones controles y lúpicos. C) Gráfico del porcentaje y número absoluto de linfocitos B IgA+IgM-. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). \* p< 0,05. \*\* p< 0,001.

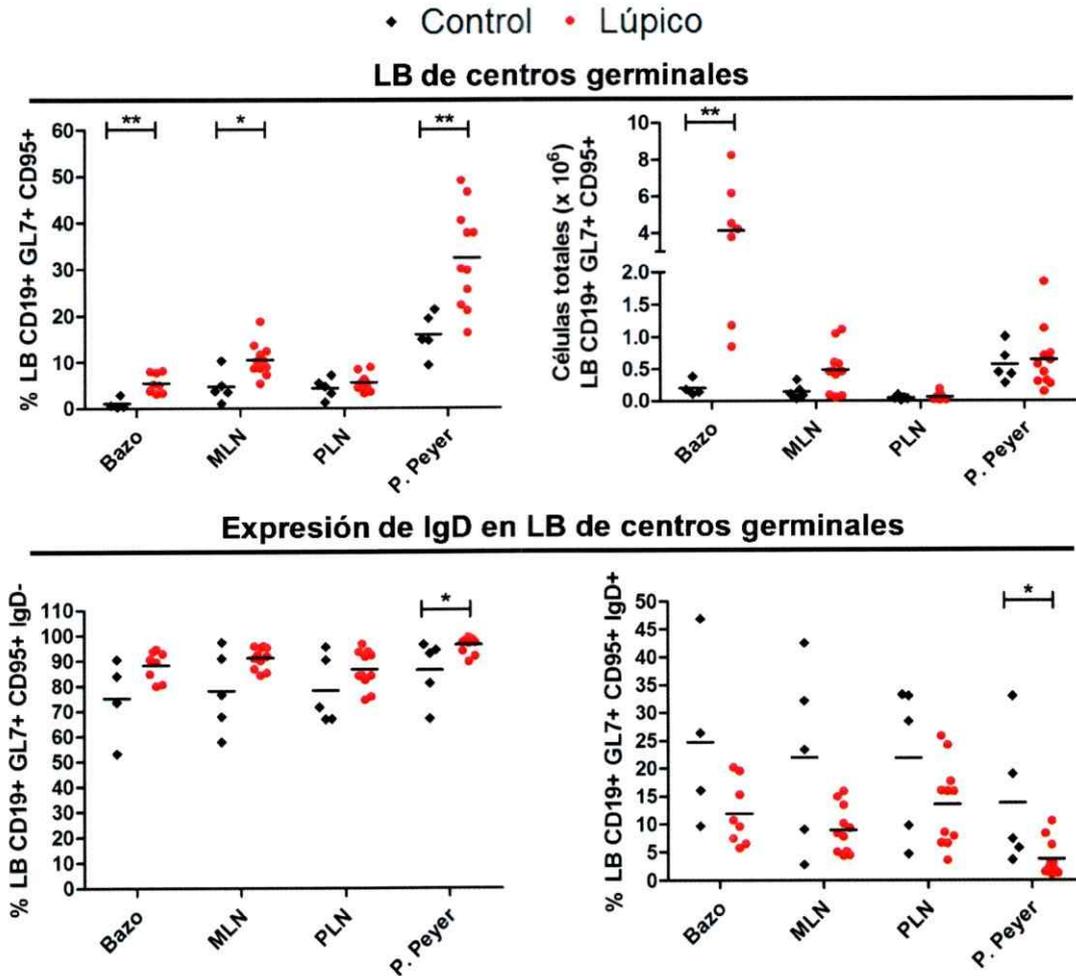
**7. Los ratones lúpicos presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B que forman centros germinales en órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles.**

Los linfocitos B vírgenes luego de activarse migran hacia los folículos linfoides y forman estructuras denominadas centros germinales (Oropallo y cols., 2014), adquiriendo un fenotipo GL7+CD95+. Esta población se analizó en los órganos linfoides secundarios dentro de una ventana de células CD19+ en ratones lúpicos y controles (Figura 11A). Se observó un aumento significativo en el porcentaje y números absolutos de linfocitos B CD19+GL7+CD95+ en el bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer de ratones lúpicos (Figura 11B).

Dentro de la población de linfocitos B que forman centros germinales se analizó la expresión de la inmunoglobulina IgD, la cual permite discriminar entre los linfocitos B vírgenes IgD+ y los linfocitos B que pierden la expresión de IgD y por lo tanto comienzan a diferenciarse hacia células de memoria. Los ratones lúpicos presentaron una tendencia al incremento del porcentaje de linfocitos B IgD- y a la disminución del porcentaje de linfocitos B IgD+, con significancia estadística en placas de Peyer en ambos casos (Figura 11B). Lo anterior indica que en los órganos linfoides secundarios de los ratones lúpicos se forman más centros germinales, donde los linfocitos B se diferencian para generar células de memoria IgD- en una mayor proporción que en los ratones controles.

**A**



**B**

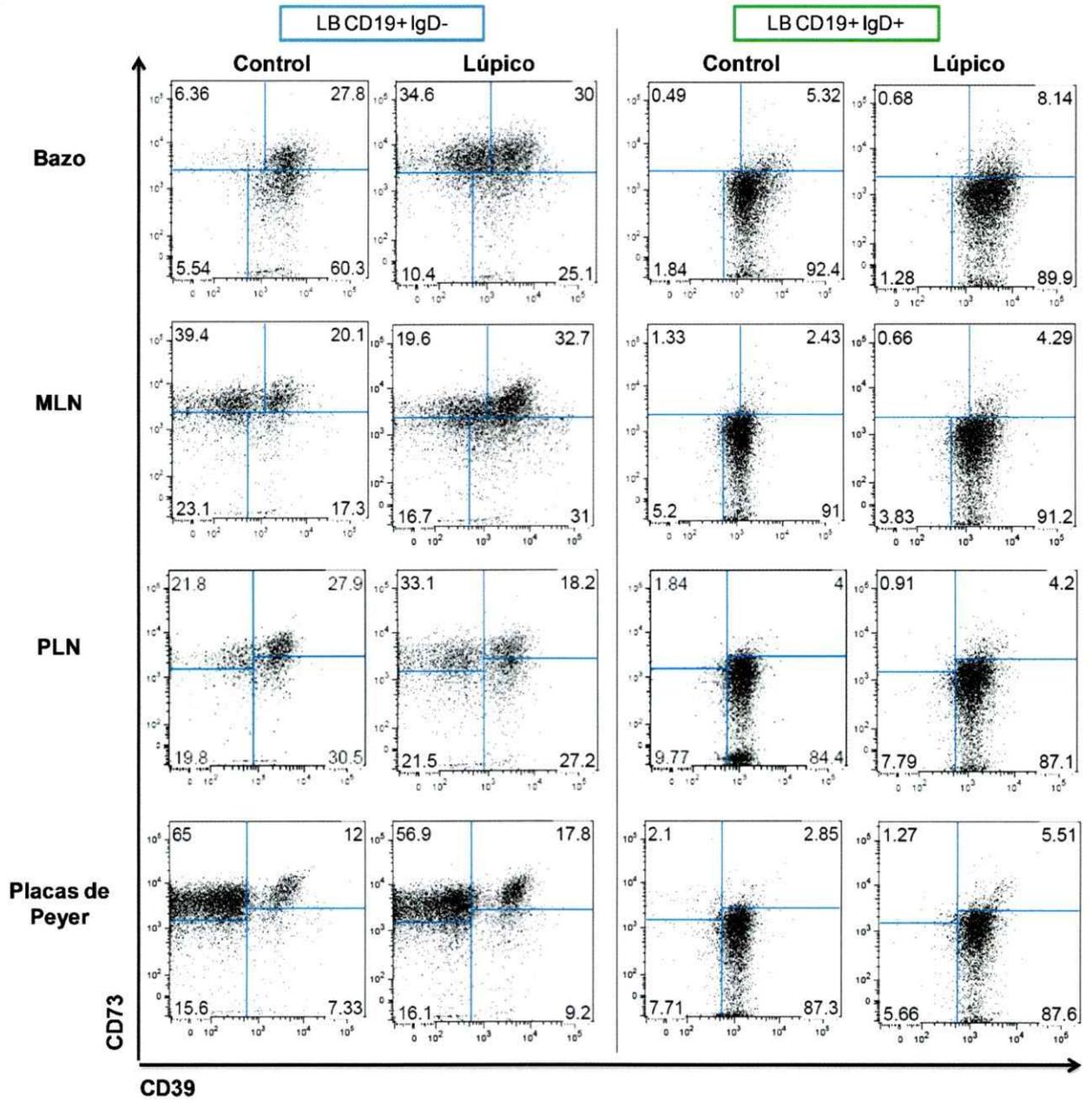
**Figura 11. Los ratones lúpicos presentan un incremento en el porcentaje de linfocitos B que forman centros germinales en órganos linfoides secundarios comparado a ratones controles.** A) Análisis representativo de las poblaciones de linfocitos B de centros germinales CD19+GL7+CD95+ en órganos linfoides secundarios de ratones controles y lúpicos. Dentro de esta población se analizó la expresión de IgD. B) Gráfico del porcentaje y número absoluto de LB de centros germinales CD19+GL7+CD95+ y del porcentaje de células IgD- e IgD+ dentro de la población mencionada. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,001$ .

## **8. Los linfocitos B de memoria presentes en los diferentes órganos linfoides expresan CD73 en ratones lúpicos y controles.**

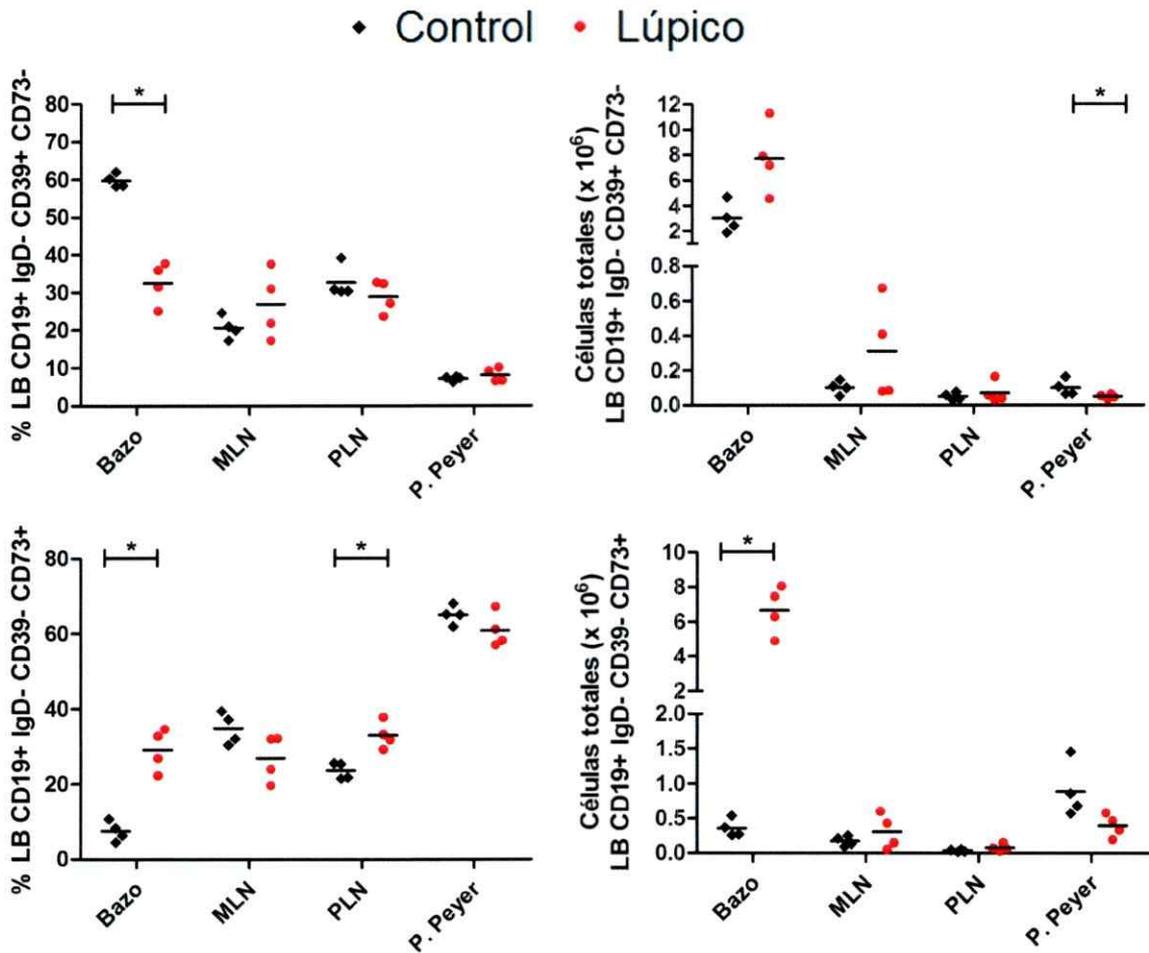
Las moléculas CD39 y CD73 son ectonucleotidasas involucradas en el metabolismo del ATP y se han descrito principalmente en los linfocitos T. No obstante, recientemente han sido descritas en los linfocitos B y en particular se les ha atribuido un papel importante en el proceso del cambio de isotipo de inmunoglobulina (Scheny y cols., 2013).

A raíz de lo anterior se analizó la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos B de ratones lúpicos. Dentro de la población de linfocitos B CD19<sup>+</sup> se seleccionó una ventana de eventos IgD<sup>+</sup> (linfocitos B vírgenes) y otra de eventos IgD<sup>-</sup> (linfocitos B de memoria); y dentro de estas ventanas analizamos la expresión de CD39 y CD73. En la figura 12 observamos que la población de linfocitos B vírgenes IgD<sup>+</sup> posee un fenotipo CD39<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> y que los linfocitos B de memoria IgD<sup>-</sup> son principalmente CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> y CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> (Figura 12A). Al analizar los porcentajes de las poblaciones mencionadas en los distintos órganos linfoides se encontró una disminución de las células CD39<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> y un aumento significativo de las células CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> en el bazo de ratones lúpicos en comparación a ratones controles (Figura 12B), lo cual indica que en los ratones lúpicos existe un aumento de linfocitos B de memoria IgD<sup>-</sup> que expresan el marcador CD73<sup>+</sup>.

**A**



**B**



**Figura 12. Los linfocitos B de memoria expresan CD73 en los órganos linfoides de ratones controles y lúpicos.** A) Estrategia de análisis mediante citometría de flujo ejemplificada en bazo, ganglio mesentérico (MLN), ganglios periféricos (PLN) y placas de Peyer de ratones controles y lúpicos. Se analizó la expresión de CD39 y CD73 dentro de la población de linfocitos B de memoria CD19+IgD- y de las células vírgenes CD19+IgD+. B) Porcentajes y números absolutos de las sub-poblaciones CD39+CD73- y CD39-CD73+ analizadas dentro de los linfocitos B de memoria CD19+IgD-. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). \* p < 0,05. \*\* p < 0,001.

## 9. Fenotipo de los linfocitos B activados del bazo de ratón lúpico.

A continuación estudiamos el efecto de la activación por 48 horas con CpG y anti-CD40 en las distintas sub-poblaciones de linfocitos B purificadas por *cell sorting* del bazo de ratones lúpicos. Los linfocitos B fueron obtenidos descartando las células CD11c+ (marcador de células dendríticas) y CD5+ (marcador de linfocitos B-1). Luego de la activación analizamos el fenotipo y la producción de citoquinas por citometría de flujo.

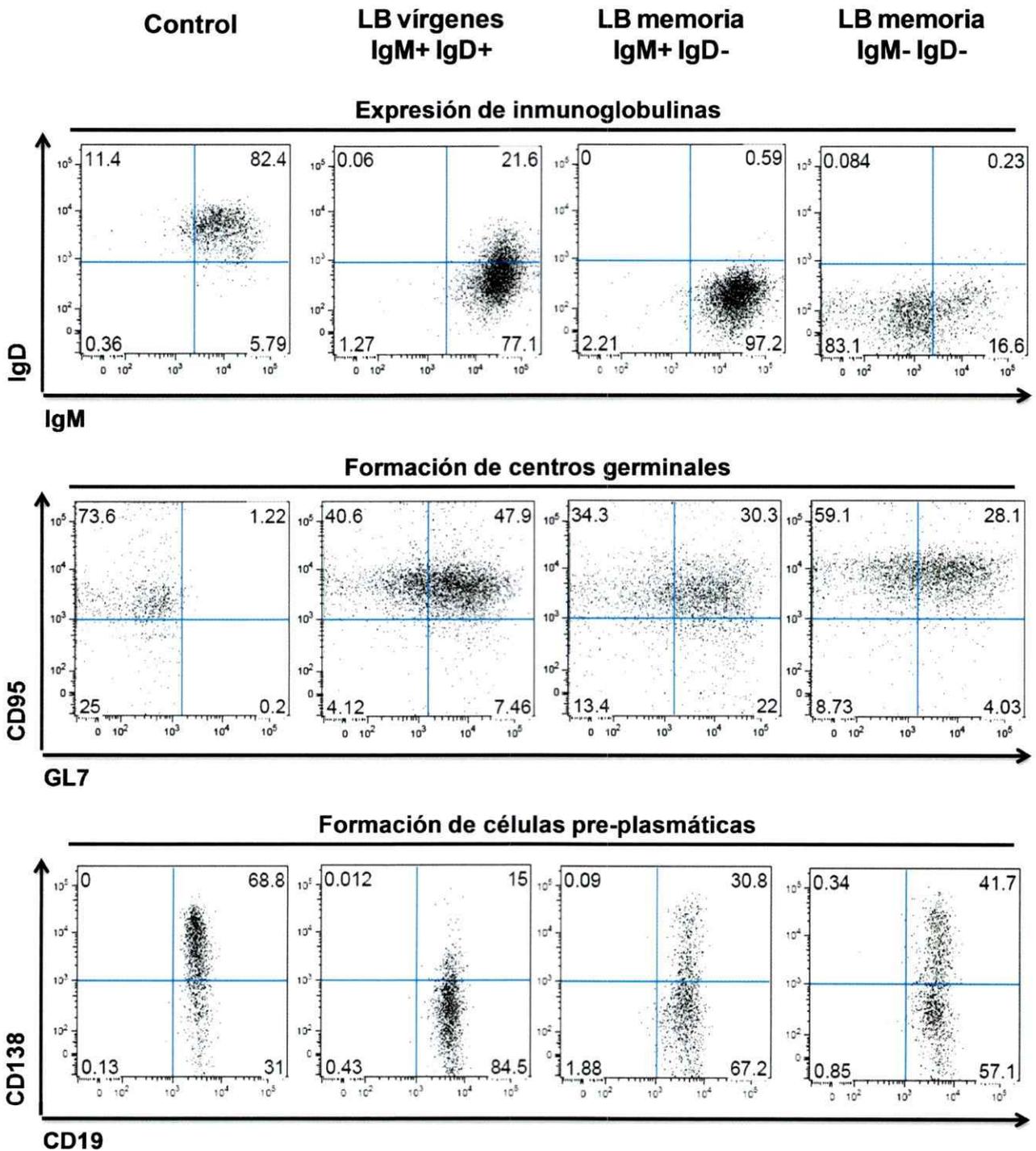
Transcurrido el período de 48 horas de activación, un 77% de linfocitos B vírgenes perdieron la expresión de IgD, transformándose principalmente en células de memoria IgM+. Los linfocitos B de memoria IgM+ mantuvieron su fenotipo, mientras que un 83,1% de los linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo mantuvieron el fenotipo (Figura 13). Al analizar la expresión de marcadores de linfocitos B que forman centros germinales se observó que los linfocitos B vírgenes presentaron el mayor porcentaje de células GL7+CD95+ (48%) en comparación a las poblaciones de linfocitos B de memoria, que bordearon el 30% (Figura 13). Posteriormente se analizó la diferenciación hacia células pre-plasmáticas y se observó que ambas poblaciones de linfocitos B de memoria aumentan la expresión de CD138. Específicamente, los linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo presentaron un 41,7% de células CD138+CD19+, mientras que los linfocitos B IgM+ presentaron un 30,8%. Los linfocitos B vírgenes presentaron el menor porcentaje de células CD138+CD19+, alcanzando un 15% (Figura 13).

Al analizar marcadores de co-estimulación se encontró que las tres sub-poblaciones de linfocitos B del ratón lúpico al activarse presentan una alta expresión de CD86, sin embargo poseen una baja expresión de CD83 (Figura 14). La expresión de

las moléculas de MHC-II y CD69 también fue alta en las tres sub-poblaciones estudiadas (Figura 14), lo cual refleja un fenotipo activado.

Por otra parte analizamos la expresión de los marcadores de linfocitos B de memoria CD80, CD73 y PD-L2 y encontramos que la población de linfocitos B de memoria clásicos expresó los niveles más altos de CD80 y CD73, sin embargo, en esta población disminuyó notablemente la expresión de PD-L2 (Figura 14A).

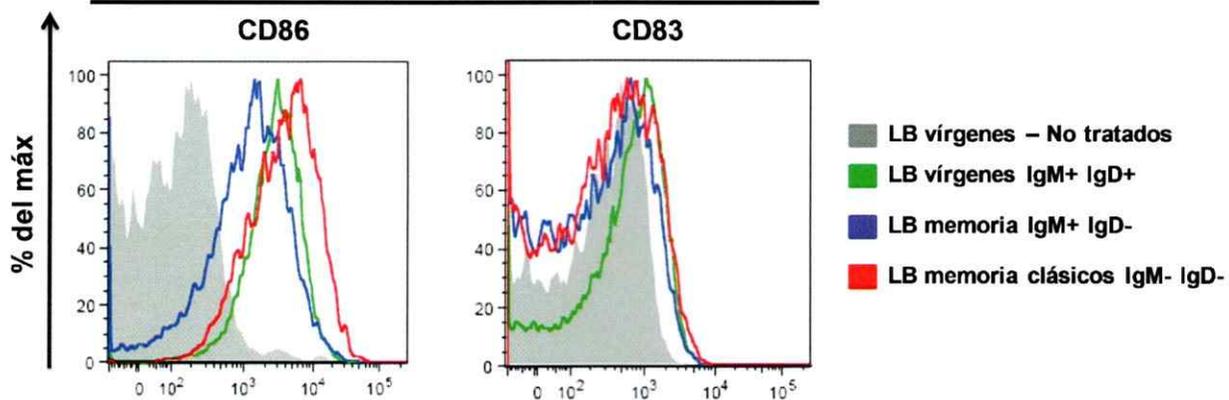
Por otra parte, también se analizó la expresión de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73 y observamos que los linfocitos B vírgenes presentaron un 11% de células CD39+CD73+ y este porcentaje aumentó a un 29% y un 72,3% para las los linfocitos B de memoria IgM+ y clásicos, respectivamente (Figura 14B), lo que indica que la expresión de CD73 se correlaciona con el fenotipo de linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo.



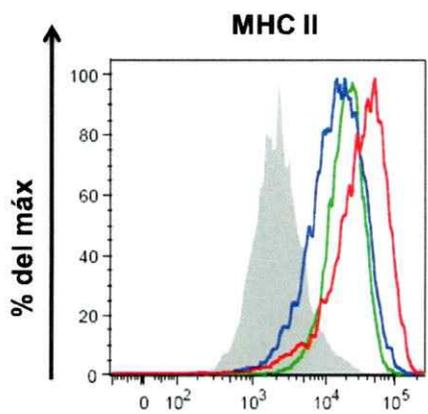
**Figura 13. Los linfocitos B de memoria de ratón lúpico al activarse expresan marcadores de centros germinales y se diferencian a células pre-plasmáticas.** Se purificaron por *cell sorting* sub-poblaciones de linfocitos B B220+ de bazo de un ratón lúpico, descartando las células CD11c+ y CD5+: LB vírgenes IgM+IgD+, LB de memoria de larga vida IgM+IgD- y LB de memoria clásicos IgM-IgD-. Fenotipo de las sub-poblaciones de linfocitos B luego de ser activadas por 48 horas con CpG 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y  $\alpha\text{-CD40}$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Análisis de la expresión de inmunoglobulinas IgM e IgD, marcadores de centros germinales GL7+CD95+ y de células plasmáticas dentro de una ventana de células B220+. Resultado de n = 1 experimento.

**A**

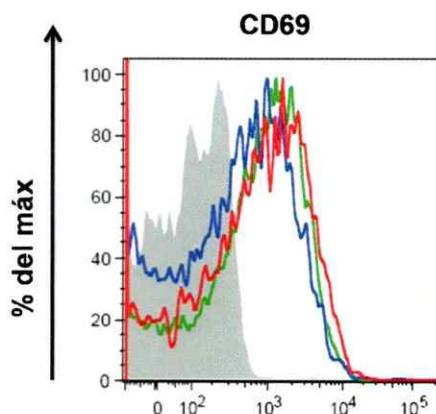
**Marcadores de co-estimulación**



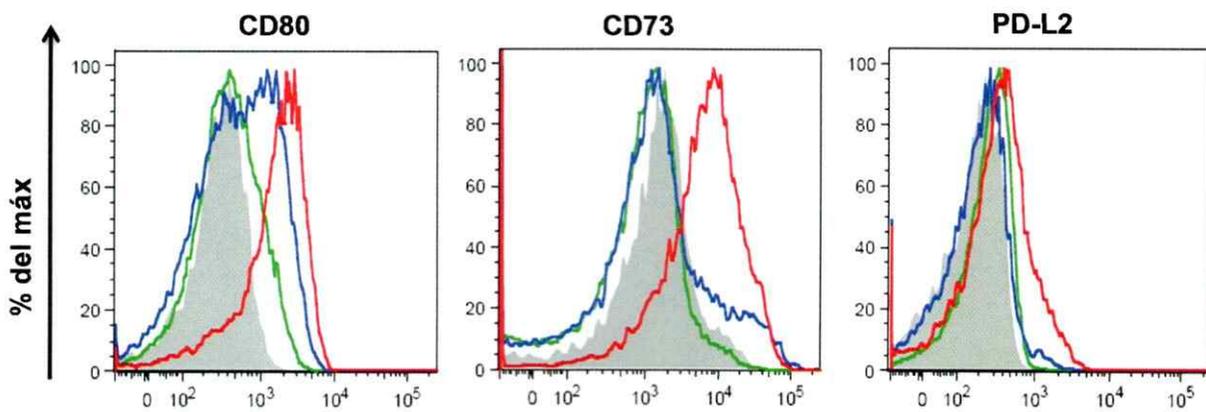
**Presentación de antígeno**



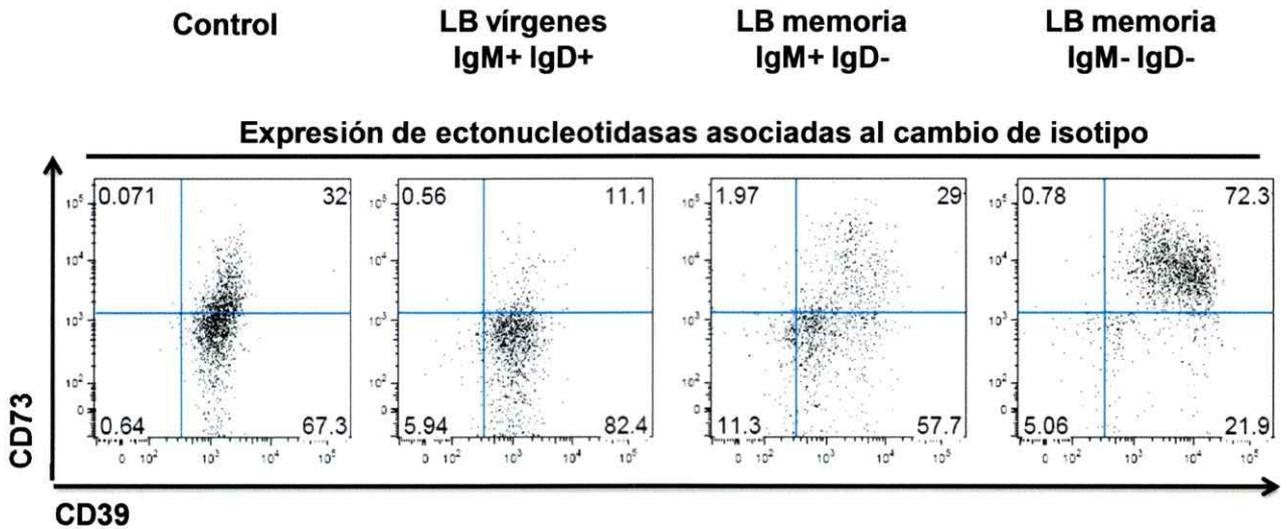
**Activación temprana**



**Memoria inmunológica**



B

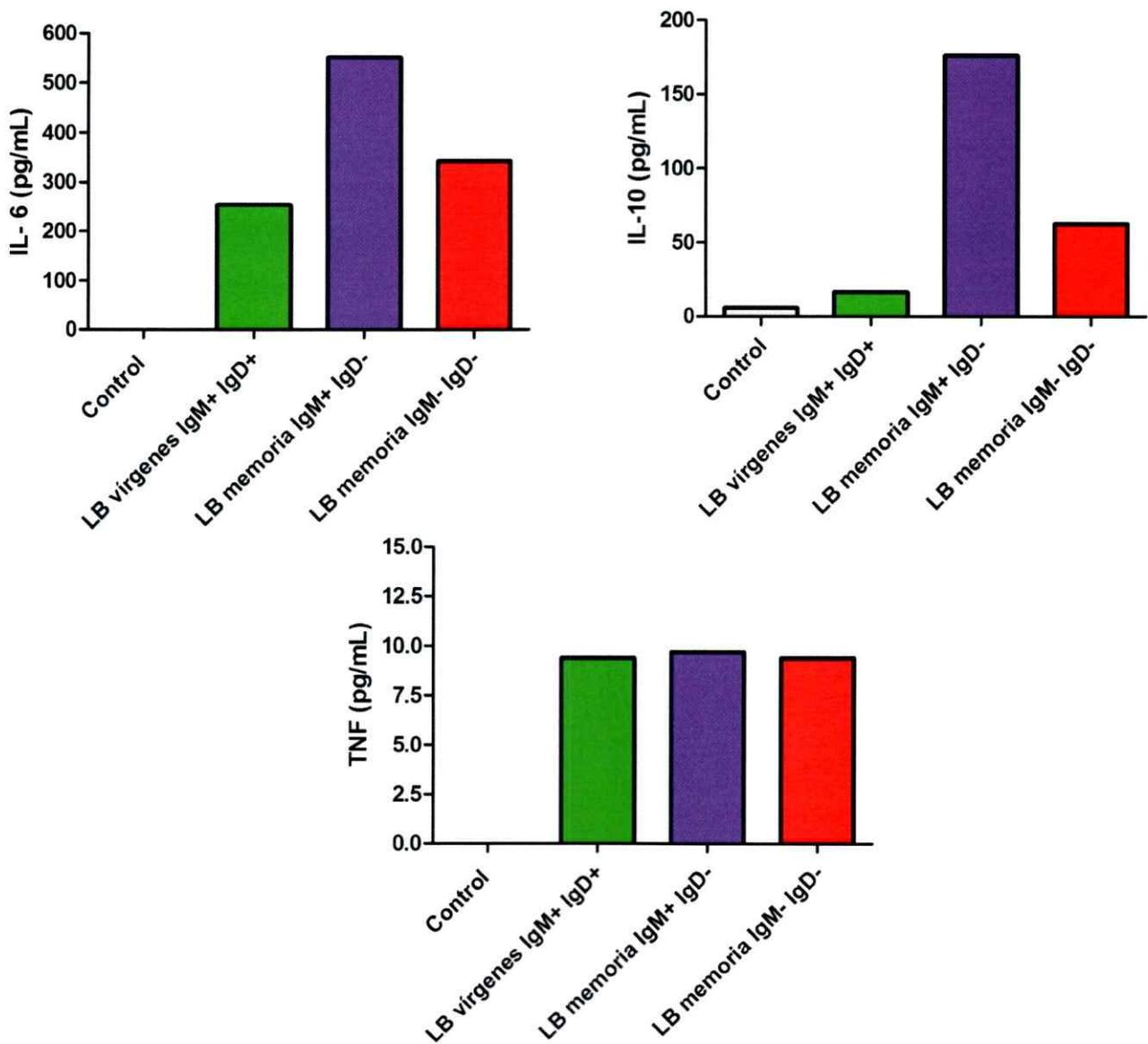


**Figura 14. Los linfocitos B de memoria clásicos del bazo de un ratón lúpico al activarse presentan una baja expresión de PD-L2. Se purificaron por *cell sorting* sub-poblaciones de linfocitos B B220+ de bazo de un ratón lúpico, descartando las células CD11c+ y CD5+: LB vírgenes IgM+IgD+, LB de memoria de larga vida IgM+IgD- y LB de memoria clásicos IgM-IgD-. Las células se activaron con CpG 2 µg/mL y α-CD40 1 µg/mL por 48 horas y el fenotipo se analizó por citometría de flujo dentro de una ventana de células B220+. A) Histogramas de la expresión de moléculas de coestimulación y de marcadores de activación y de memoria para cada sub-población. B) Gráfico de puntos de la expresión de CD39 y CD73. Resultado de n=1 experimento.**

## **10. Los linfocitos B de memoria de ratones lúpicos activados producen las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF.**

Los sobrenadantes de la activación de las sub-poblaciones de linfocitos B se analizaron mediante citometría de flujo para cuantificar la presencia de las siguientes citoquinas: IL-12p70, MCP-1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 y TNF. Sólo se detectó por sobre el límite cuantificable las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF. Los linfocitos B vírgenes IgM+IgD+ produjeron principalmente IL-6 y bajos niveles de IL-10. Ambas poblaciones de linfocitos B de memoria secretaron IL-6 en concentraciones similares a las de los linfocitos B vírgenes e IL-10 en concentraciones mayores que los linfocitos B vírgenes. Los linfocitos B de memoria que mantienen el isotipo IgM fueron la principal población productora de IL-10. No se observaron diferencias entre las tres sub-poblaciones en cuanto a la concentración de TNF producida (Figura 15).

En la Tabla IV se muestra un resumen de la expresión de los marcadores mencionados para las sub-poblaciones de linfocitos B vírgenes y de memoria en un ratón lúpico.



**Figura 15. Los linfocitos B de memoria de ratones lúpicos activados producen las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF.** Se purificaron por *cell sorting* sub-poblaciones de linfocitos B B220+ de bazo de un ratón lúpico, descartando las células CD11c+ y CD5+: LB vírgenes IgM+IgD+, LB de memoria de larga vida IgM+IgD- y LB de memoria que han hecho cambio de isotipo IgM-IgD-. Las células se activaron con CpG 2 µg/mL y α-CD40 1 µg/mL por 48 horas. Como control se cultivaron linfocitos B vírgenes no tratados. Los sobrenadantes se analizaron por citometría de flujo. Resultado de n = 1 experimento.

Tabla IV. Características principales de los linfocitos B de ratón lúpico activados *in vitro*

(\*).

	Linfocitos B vírgenes IgM+IgD+	Linfocitos B memoria IgM+IgD-	Linfocitos B memoria clásicos IgM-IgD-
% LB con fenotipo IgM/IgD inicial	21,6%	97,2%	83,1%
% LB de centros germinales GL7+CD95+	47,9%	30,3%	28,1%
% Diferenciación a células pre-plasmáticas CD138+CD19+	15,0%	30,8%	41,7%
Expresión de CD86	++	+	+++
CD83	-	-	-
Iad-MHC-II	++	+	+++
CD69	++	++	++
CD80	-	+	++
CD73	-	+	++
PD-L2	-	-	-
% LB CD80+CD73+	2,9%	15,1%	63,4%
% LB PD-L2+CD73+	0,3%	2,5%	14,0%
% LB CD39+CD73+	11,1%	29,0%	72,3%
Producción de IL-6	+	++	+
IL-10	-	+++	+
TNF	+	+	+

(\*) Activación de linfocitos B con CpG y anti-CD40.

**11. Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de la zona marginal CD21+ CD23- en comparación a ratones controles.**

Dentro del linaje de linfocitos B del tipo B-2 se han descrito tres poblaciones de acuerdo a los marcadores CD21 y CD23: los linfocitos B foliculares (CD21+CD23+), los linfocitos B de la zona marginal (CD21+CD23-) y los linfocitos B de transición (CD21-CD23-) (Naradikian y cols., 2014) (Figura 16A). Resultados recientes muestran que a partir de los linfocitos B de la zona marginal se podrían generar linfocitos B de memoria IgM+, ya que existiría una correlación entre ambas poblaciones y comparten la expresión de la inmunoglobulina IgM (Pillai y Cariappa, 2009). Al analizar estas tres poblaciones en los órganos linfoides secundarios de ratones controles observamos que los linfocitos B de la zona marginal se encuentran sólo en el bazo, alcanzando un porcentaje de un 8% (Figura 16B). Los linfocitos B foliculares representan la población predominante en los órganos linfoides secundarios de los ratones controles.

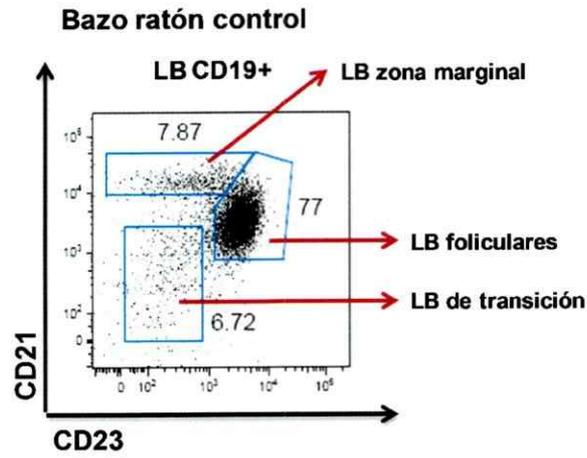
Al analizar la expresión de CD21 y CD23 en los linfocitos B foliculares, los linfocitos B de la zona marginal y los linfocitos B de transición en los ratones lúpicos encontramos que estas tres poblaciones poseen intensidades medias de fluorescencia para estos marcadores inferiores a las de los ratones controles (Figura 16B). En los órganos linfoides secundarios de los ratones lúpicos el porcentaje de la población de linfocitos B foliculares está notablemente disminuida, mientras que los linfocitos B de la zona marginal y los linfocitos B de transición se encuentran aumentadas comparadas a los ratones controles (Figura 16C).

Dado que los linfocitos B de la zona marginal además de presentar un fenotipo CD21+CD23- expresan la inmunoglobulina IgM y CD1d (Pillai y cols., 2005) analizamos dentro de la población de linfocitos B CD21+CD23- el porcentaje de células

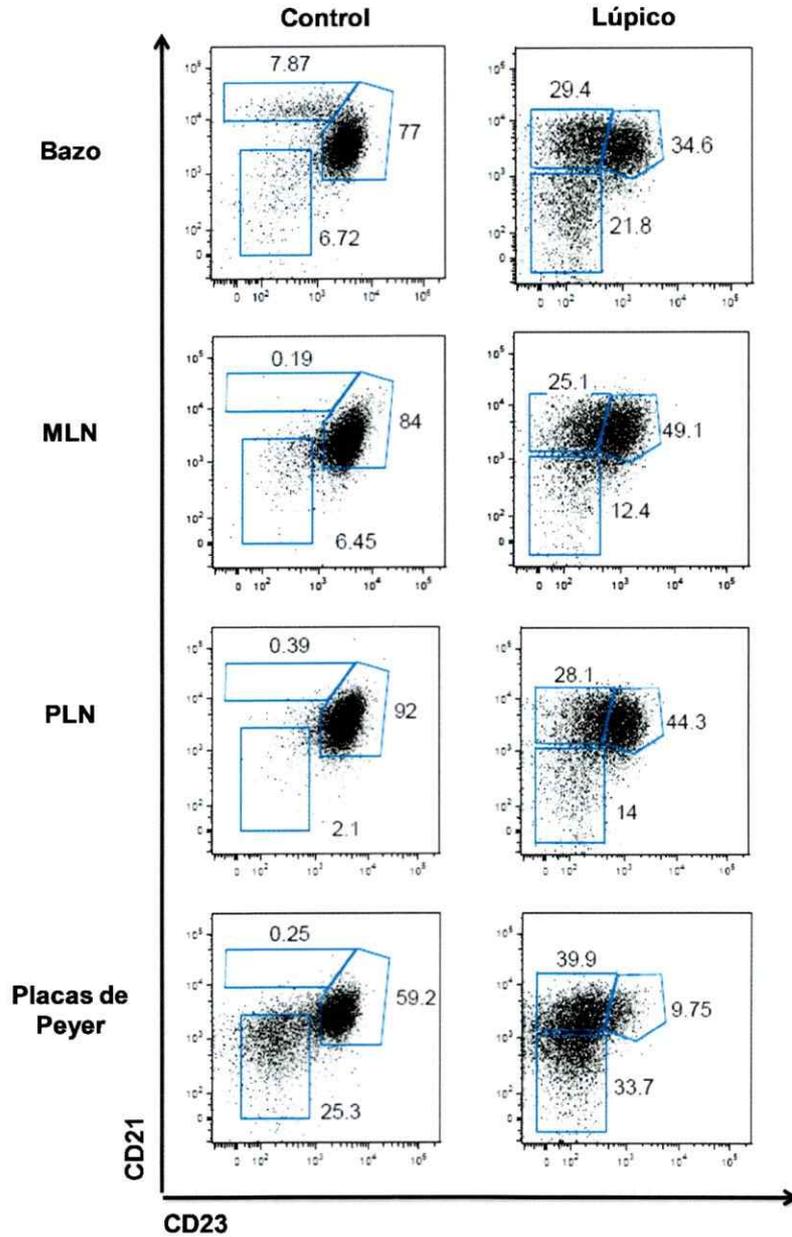


IgM+CD1d<sup>+</sup> (Figura 16D). En el bazo de ratones controles observamos que aproximadamente un 95% de los linfocitos B de la zona marginal co-expresan IgM y CD1d, mientras que ese porcentaje disminuyó a un 69% en ratones lúpicos (Figura 14D). Al analizar los valores de la intensidad media de fluorescencia de IgM y CD1d se observó una disminución significativa en el bazo de ratones lúpicos en comparación a ratones controles (Figura 16E). En la Tabla V se muestra un resumen de las características más relevantes encontradas en el estudio de los linfocitos B de memoria en el lupus, destacando las diferencias significativas entre ratones lúpicos y controles.

**A**



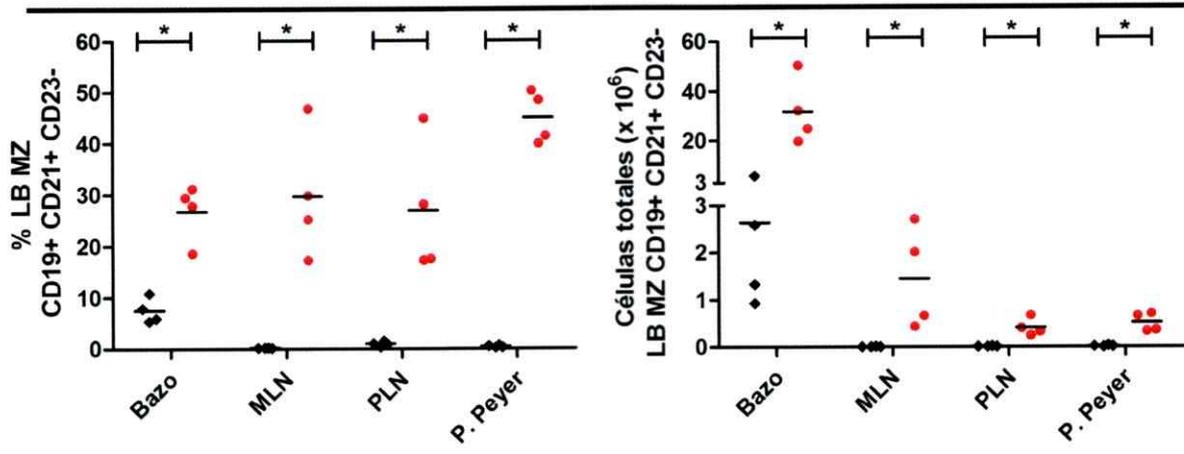
**B**



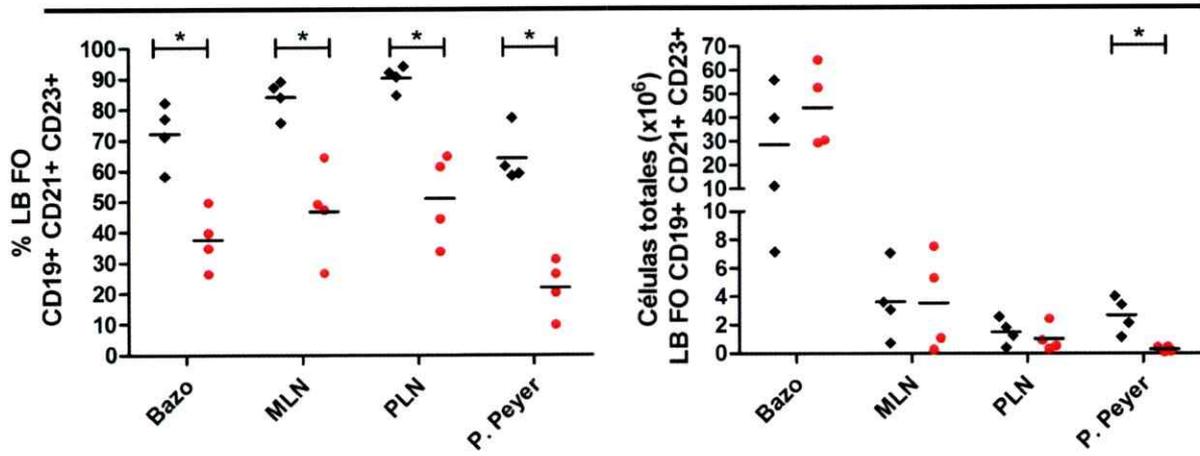
C

◆ Control    ● Lúpico

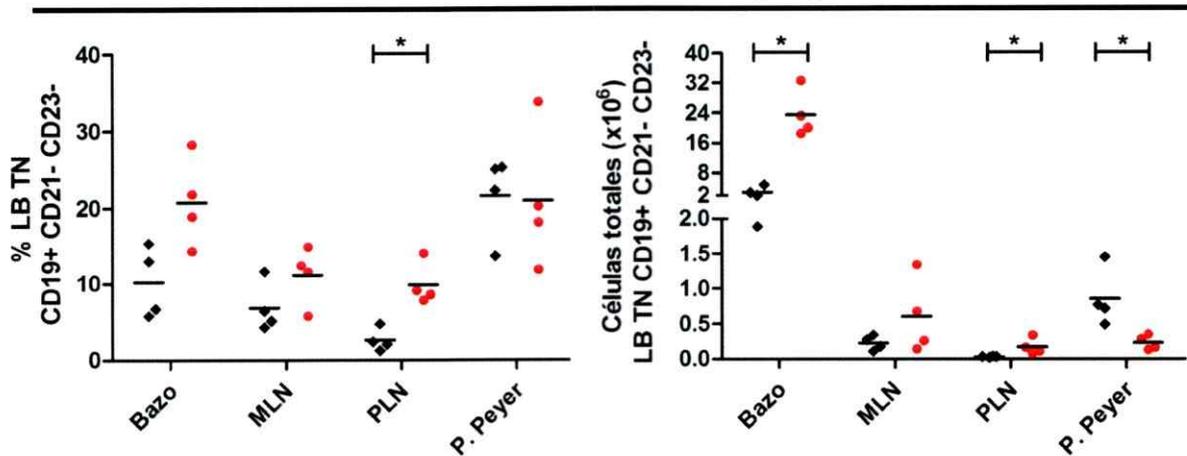
**LB de la zona marginal (MZ)**

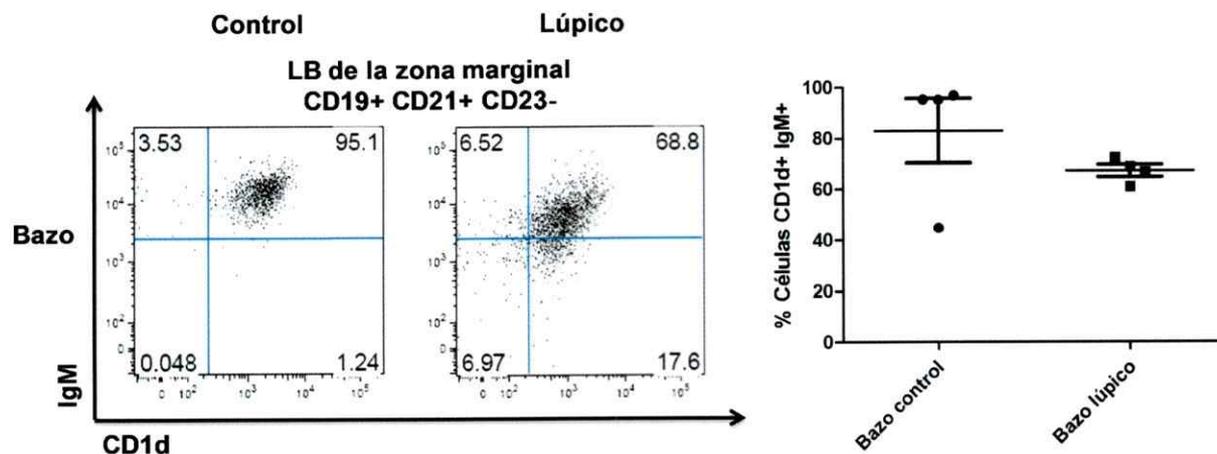
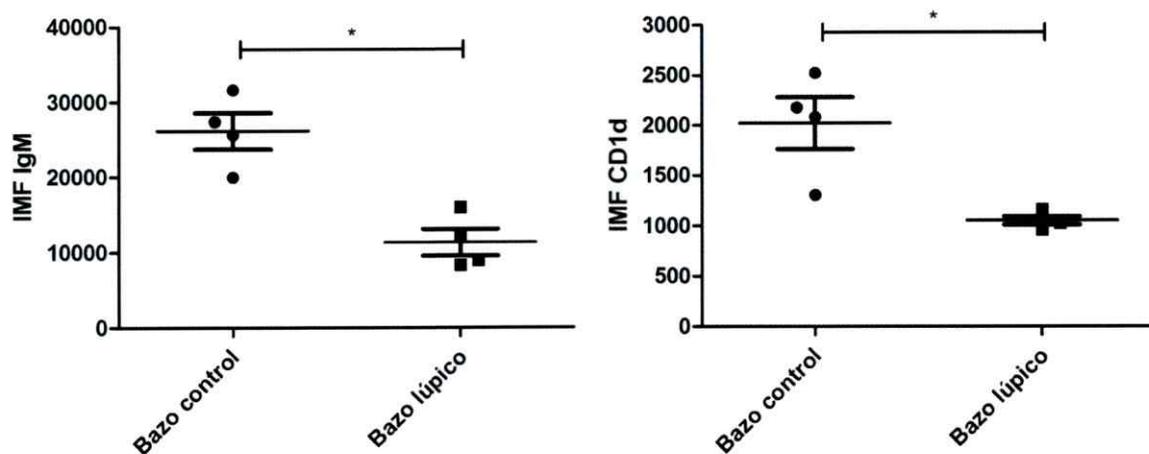


**LB foliculares (FO)**



**LB de transición (TN)**



**D****E**

**Figura 16.** Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de la zona marginal CD21+ CD23- en los órganos linfoides secundarios en comparación a ratones controles. A) Análisis de las sub-poblaciones de LB de la zona marginal CD21+CD23-, LB foliculares CD21+CD23+ y LB de transición CD21-CD23- en una ventana de eventos CD19+ en bazo. B) Análisis representativo en bazo, ganglio mesentérico (MLN), ganglios periféricos (PLN), y placas de Peyer. C) Porcentajes y números absolutos de las sub-poblaciones de linfocitos B analizadas en los distintos órganos linfoides. D) Análisis de la expresión de IgM y CD1d dentro de la población de linfocitos B de la zona marginal CD21+CD23-. E) Intensidad media de fluorescencia de IgM y CD1d dentro de la población de LB marginales. El análisis estadístico se realizó a través de un test no paramétrico (Mann-Whitney). \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,001$ .

Tabla V. Resumen de las características esenciales de los linfocitos B de memoria en ratones lúpicos (NZB x NZW) F1.

<i>Sub-población</i>	<i>Órgano*</i>	<i>Control</i>	<i>Lúpico</i>
% LB totales	PLN	6,02 ± 3,40	14,48 ± 7,89
	Timo	1,49 ± 1,28	8,25 ± 9,04
% LB memoria clásicos	Bazo	3,16 ± 0,97	5,78 ± 1,49
	Timo	50,33 ± 15,49	27,18 ± 7,83
% LB memoria IgM+	PLN	4,85 ± 1,37	10,84 ± 4,85
	Timo	6,12 ± 3,70	17,89 ± 9,43
% LB vírgenes	MLN	78,10 ± 1,33	66,37 ± 8,58
	P.P	67,3 ± 5,80	56,26 ± 10,18
	Timo	19,33 ± 15,95	34,23 ± 13,38
% LB de centros germinales (GC)	Bazo	1,05 ± 1,23	5,47 ± 2,13
	MLN	4,70 ± 3,44	10,47 ± 3,62
	P.P	15,93 ± 4,66	32,39 ± 10,75
% LB GC IgD- (LB memoria en formación)	P.P	86,22 ± 12,27	96,21 ± 3,17
% LB GC IgD+ (LB vírgenes dentro de GC)	P.P.	13,78 ± 12,27	3,80 ± 3,17
% LB IgD- CD39+ CD73-	Bazo	59,78 ± 1,74	32,55 ± 5,61
% LB IgD- CD39- CD73+	Bazo	7,48 ± 2,65	29,08 ± 5,66
	PLN	23,55 ± 2,20	32,90 ± 3,66
% LB de zona marginal	Bazo	7,52 ± 2,50	26,70 ± 5,63
	MLN	0,20 ± 0,02	29,73 ± 12,51
	PLN	0,957 ± 0,48	26,93 ± 13,01
	P.P	0,420 ± 0,21	45,00 ± 5,12
% LB foliculares	Bazo	72,23 ± 10,31	37,53 ± 9,74
	MLN	84,00 ± 5,92	46,83 ± 15,53
	PLN	90,33 ± 4,05	51,05 ± 14,64
	P.P	64,15 ± 8,87	21,89 ± 9,22
% LB de transición	PLN	2,62 ± 1,49	9,86 ± 2,81

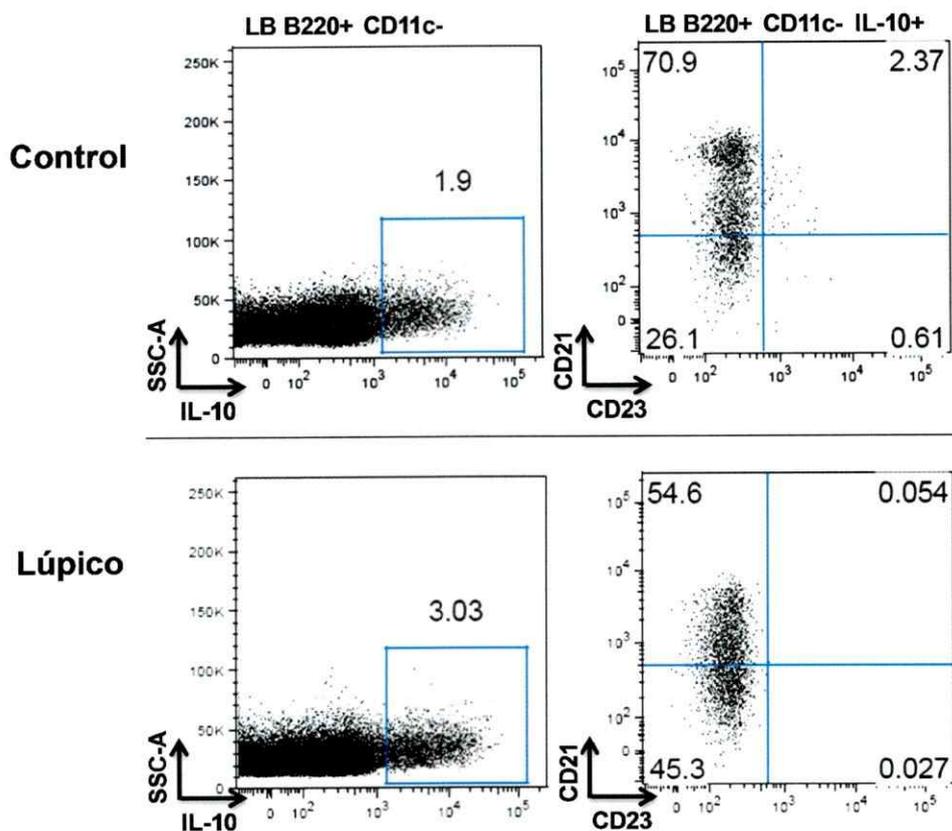
\*PLN: ganglios periféricos, MLN: ganglios periféricos, P.P: Placas de Peyer.

## **12. Los linfocitos B de la zona marginal CD21+ CD23- producen IL-10 en los ratones lúpicos y controles.**

Nuestros resultados anteriores con los ratones inmunizados demostraron que al activar los linfocitos B, sólo los linfocitos B de memoria producen IL-10. Para estudiar si existe una correlación entre la producción de IL-10 y las sub-poblaciones de linfocitos B de la zona marginal, foliculares o de transición, los esplenocitos de un ratón control y lúpico fueron activados por 5 hrs con PMA, Ionomicina, LPS y monensina y posteriormente analizados por citometría de flujo.

Al analizar la población de linfocitos B productores de IL-10 encontramos que los linfocitos B de la zona marginal producen principalmente esta citoquina en el ratón control y lúpico (70,9% y 54,6%, respectivamente) (Figura 17). Los linfocitos B de transición CD21-CD23- presentaron una contribución menor a la producción de IL-10. Los resultados previos obtenidos muestran que los linfocitos B de la zona marginal expresan IgM y al ser activados producen IL-10, características que indican que los linfocitos B de la zona marginal presentan un fenotipo de linfocito B de memoria IgM+.

### Fenotipo post activación



**Figura 17.** Los linfocitos B de la zona marginal CD21+CD23- producen IL-10 en ratones **control** y **lúpico**. Fenotipo de linfocitos B luego de 5 horas de activación con PMA, Ionomicina, LPS y monensina. Dentro de la población de linfocitos B B220+CD11c-IL-10+ se muestra la expresión de CD21 y CD23. Resultado de n = 1 experimento.

## DISCUSION

### Caracterización de los linfocitos B de memoria murinos (modelo de ratones inmunizados).

Existen numerosas evidencias que demuestran el papel esencial de los linfocitos B en el desarrollo del lupus. Últimamente se ha propuesto que los linfocitos B no son sólo células capaces de diferenciarse a células productoras de anticuerpos, sino que también son células presentadoras de antígenos, células productoras de citoquinas, y células cooperadoras en la diferenciación hacia linfocitos T reguladores, produciendo efectos importantes en el sitio donde se localizan estas funciones (Mauri y Bosma, 2012; Sang y cols., 2013). El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar los linfocitos B de memoria en ratones enfermos de lupus. El fenotipo de los linfocitos B de memoria parece estar bastante esclarecido en humanos, sin embargo en ratones no existe claridad respecto de este punto. Por lo tanto nuestra primera aproximación fue caracterizar los linfocitos B de memoria utilizando un protocolo de inmunización estándar de ratones para posteriormente utilizar esta información para estudiar los linfocitos B de memoria en ratones que desarrollan lupus.

Para la búsqueda de marcadores de superficie que nos permitiesen distinguir linfocitos B de memoria en ratones utilizamos ratones Balb/c jóvenes de aproximadamente 2 meses de edad, los que inmunizamos semanalmente con ovoalbúmina, la que sabemos genera una respuesta inmune humoral dependiente de los linfocitos T (Hou y cols., 2011).

Para el análisis de los linfocitos B mediante citometría de flujo se utilizaron los marcadores de linaje CD19 y B220. En la mayoría de los análisis descartamos las células CD11c+ puesto que comúnmente se ha descrito como marcador de células

dendríticas (Singh-Jasuja y cols., 2013). Sin embargo, literatura reciente ha demostrado que las células CD19+CD11c+ en efecto corresponden a linfocitos B capaces de producir y secretar inmunoglobulinas (Yates y cols., 2013). De todas formas la población CD19+CD11c+ no superó el 2% de las células, por lo tanto no deberían modificar significativamente los resultados obtenidos.

Los linfocitos B se estudiaron en el bazo debido a que es el órgano linfoide secundario principal y es filtrador de la sangre (Mebius y Kraal, 2005; Hidalgo y cols., 2012), en ganglio mesentérico y placas de Peyer por su contribución a la inmunidad intestinal (Weinstein y cols., 1991), en linfonodos periféricos y en el timo, puesto que resultados previos de nuestro laboratorio muestran una migración de linfocitos B hacia el timo en condiciones de inflamación (Fuentes, 2014). Cabe destacar que al analizar la población de linfocitos B totales en los órganos linfoides de los ratones inmunizados se encontraron diferencias significativas sólo en el timo, donde en ratones controles existe un 0,3% de linfocitos B comparado a un 10% en los ratones inmunizados (Figura 3). Recientemente se ha descrito que los linfocitos B pueden migrar desde la periferia hacia el timo durante procesos inflamatorios en un mecanismo dependiente de MCP-1/CCR2 (Hodge y cols., 2012), lo cual podría explicar el fenómeno observado.

En base al análisis por citometría de flujo de la expresión de las inmunoglobulinas IgM e IgD se identificaron tres sub-poblaciones de linfocitos B: los linfocitos B vírgenes IgM+IgD+, los linfocitos B de memoria que mantienen el isotipo IgM (IgM+IgD-) y los linfocitos B de memoria clásicos que han realizado el proceso de cambio de clase de inmunoglobulina (IgM-IgD-). De estos análisis el resultado más destacable es que en el timo de ratones inmunizados se produce una disminución significativa de linfocitos B de memoria tanto clásicos como IgM+ y un aumento de

linfocitos B vírgenes en comparación a ratones controles (Figura 4C). Se ha reportado que el timo es constantemente repoblado por progenitores derivados de la médula ósea, los cuales poseen un potencial de diferenciación hacia linfocitos B (Zlotoff y cols., 2010; Luc y cols., 2012). De esta forma, las inmunizaciones sucesivas y el ambiente inflamatorio podrían ejercer un efecto en la migración de progenitores de linfocitos B hacia el timo de manera tal que se induzca un aumento en los linfocitos B vírgenes.

Los linfocitos B, además de ser capaces de diferenciarse a células plasmáticas, juegan un papel importante en la respuesta inmune ya que son capaces de activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante la presentación de antígenos y la producción de citoquinas (Barnett y cols., 2014). Para estudiar el patrón de citoquinas producido por los linfocitos B, purificamos mediante *cell sorting* las sub-poblaciones de linfocitos B (vírgenes, de memoria clásicos y de memoria IgM<sup>+</sup>) y los activamos durante 48 horas con CpG y anti-CD40, estímulos que activan policlonalmente a los linfocitos B. Los oligonucleótidos sintéticos CpG corresponden a dinucleótidos no metilados presentes en alta frecuencia en ADN bacteriano, los cuales poseen un efecto inmunoestimulador, activando a los linfocitos B mediante el receptor TLR9 (Krieg y cols., 1995). Por otra parte, la estimulación mediante el anticuerpo anti-CD40 emula la señal que los linfocitos T cooperadores le otorgan a los linfocitos B para su activación, induciendo la maduración hacia células productoras de anticuerpos (Lane y cols., 1993; Banchereau y cols., 1994). Al analizar por citometría de flujo la presencia de las citoquinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12p70 en los sobrenadantes de las células activadas encontramos solamente IL-6, IL-10 y TNF. Los linfocitos B vírgenes produjeron altos niveles de IL-6 pero bajísimos niveles de IL-10. Los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> fueron los principales productores de IL-10 y además produjeron IL-6 en niveles

similares a los linfocitos B vírgenes. Los linfocitos B de memoria clásicos producen IL-10 e IL-6 en concentraciones inferiores a las células de memoria IgM+ (Figura 5). No se observaron diferencias en la producción de TNF entre las diferentes subpoblaciones estudiadas.

Se ha descrito que IL-6 y TNF (factor de necrosis tumoral) corresponden a citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la IL-10 juega un papel importante en la supresión de la respuesta inmune e inducción de tolerancia (Lund, 2008). De esta forma, existe una dicotomía en el repertorio de citoquinas producidas por los linfocitos B vírgenes y los linfocitos B de memoria. En particular, IL-6 y TNF participan en la formación de células plasmáticas (Akira y cols., 1990) y en la producción de anticuerpos en respuestas dependientes de los linfocitos T (Lund, 2008), respectivamente. En nuestros resultados encontramos que la producción de IL-10 por parte de los linfocitos B se asocia a un fenotipo de memoria, lo cual concuerda con estudios realizados en linfocitos B humanos donde se ha descrito que los linfocitos B productores de IL-10 se encuentran enriquecidos en la población de células de memoria CD27+ (Bouaziz y cols., 2010) y que la secreción de IL-10 por parte de linfocitos B humanos posee un efecto autocrino, promoviendo la diferenciación hacia plasmablastos productores de anticuerpos IgM o IgG (Heine y cols., 2014).

Al analizar el fenotipo de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos B activados encontramos que los linfocitos B vírgenes presentaron un alto porcentaje de células que forman centros germinales (GL7+CD95+), expresan moléculas de co-estimulación CD86 y CD83, marcadores de activación tempranos como CD69 y moléculas de presentación de antígeno MHC-II (Figura 6 y 7). Este fenotipo observado es consistente con la función de los linfocitos B vírgenes, ya que luego de reconocer el

antígeno se activan, proliferan, forman centros germinales y comienzan con el proceso de diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos y hacia la formación de linfocitos B de memoria (Oropallo y cols., 2014). Las sub-poblaciones de linfocitos B de memoria al ser activadas también presentaron una alta expresión de los marcadores de co-estimulación, activación, de diferenciación hacia células pre-plasmáticas y de presentación de antígenos previamente mencionados, lo que sugiere que podrían ejercer un papel importante en la activación de linfocitos T durante las respuestas inmunes secundarias. Los linfocitos B de memoria mediante la producción de IL-10 también podrían participar en procesos de inducción de tolerancia, ya que esta citoquina posee un rol clave en la inhibición de la función de citoquinas pro-inflamatorias, favorece la diferenciación hacia linfocitos T reguladores y suprime la activación de linfocitos T CD4+ (Mauri y Bosma, 2012).

En este trabajo estudiamos otros marcadores de linfocitos B de memoria descritos en la literatura reciente como son CD80, PD-L2 y CD73. (Bergmann y cols., 2013; Weill y cols., 2013). La expresión de CD80 en los linfocitos B estimula el desarrollo de linfocitos T foliculares, los cuales son necesarios para la generación de centros germinales, además favorece la supervivencia y la generación de células plasmáticas (Good-Jacobson y cols., 2012) mientras que PD-L2 inhibe la activación de los linfocitos T mediante la interacción con PD-1 (Latchman y cols., 2001). CD73 es una ecto-nucleotidasa que participa en el metabolismo del ATP y es expresada por los linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo de inmunoglobulina (Schena y cols., 2013). En forma consistente con lo descrito, nuestros resultados muestran que la población de linfocitos B de memoria clásicos al activarse expresan

estos marcadores con una mayor intensidad media de fluorescencia que los linfocitos B vírgenes y los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> (Figura 7).

### **Linfocitos B de memoria en el lupus.**

El objetivo central de este trabajo fue estudiar los linfocitos B de memoria en ratones que desarrollan lupus. Para esto nos basamos en las características que determinamos de los linfocitos B de memoria de ratones inmunizados.

En este trabajo utilizamos el modelo murino de la enfermedad [NZBW]F1, que es aquel que se asemeja más a la patología desarrollada en humanos. Utilizamos hembras de 6 meses de edad que presentaron los síntomas asociados a la enfermedad: daño renal y producción de auto-anticuerpos anti ADN de doble hebra. Como cepa control se utilizaron ratones [NZW x Balb/c]F1 pareados por sexo y edad.

El estudio de los linfocitos B de memoria puede proveer conocimiento relevante para el diseño de nuevas terapias para las enfermedades autoinmunes. Los linfocitos B de memoria confieren una respuesta rápida y potenciada frente a un antígeno. Esto es beneficioso cuando la respuesta permite eliminar algo dañino para el organismo, pero es perjudicial cuando la respuesta es contra sus propios componentes como ocurre en las enfermedades autoinmunes.

En este trabajo analizamos la frecuencia de las sub-poblaciones de linfocitos B vírgenes, linfocitos B de memoria clásicos y linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> y encontramos que en los órganos linfoides secundarios de los ratones lúpicos existe una disminución en el porcentaje de linfocitos B vírgenes y un aumento del porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos o IgM<sup>+</sup> (Figura 9B), concordante con la

enfermedad. Estos resultados podrían deberse a la presencia intrínseca de una mayor proporción de linfocitos B auto-reactivos y su constante activación en presencia de antígenos propios o a fallas en los mecanismos de tolerancia hacia células auto-reactivas. Varios mecanismos han sido invocados en la generación de linfocitos B auto-reactivos, como por ejemplo la duplicación de genes de los receptores TLR7 capaces de reconocer ARN (Pisitkun y cols., 2006), la edición excesiva del receptor BCR (Gay y cols., 2011) y una delección fallida del repertorio de linfocitos B auto-reactivos (Luning-Prak y cols., 2011).

Una diferencia notoria entre ratones lúpicos y controles fue el incremento de linfocitos B totales en el timo de ratones lúpicos (Figura 8B). Recientemente se ha descrito que los linfocitos B durante procesos infecciosos o en condiciones de inflamación, como es el caso del lupus, son capaces de migrar desde la periferia hacia el timo (Hodge y cols., 2012). En un trabajo publicado por Perera y cols., 2013 se muestra que en condiciones normales los linfocitos B en el timo que son auto-reactivos son capaces de presentar auto-antígenos a linfocitos T, promoviendo la eliminación de los linfocitos T auto-reactivos mediante selección negativa. En el caso del lupus, este mecanismo de tolerancia podría presentar fallas y de esta forma contribuiría a un incremento de la frecuencia de linfocitos T auto-reactivos que podrían migrar a la periferia y causar daño. Dado que el timo es constantemente repoblado por progenitores de linfocitos B de la médula ósea (Luc y cols., 2012), el ambiente inflamatorio crónico del lupus podría inducir un aumento en la migración de estas células y un aumento en los linfocitos B vírgenes tal como observamos en este estudio (Figura 9B). Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el timo de ratones lúpicos presenta una proporción inferior de linfocitos B GL7+ (marcador

de centros germinales) comparados con ratones controles (Fuentes, 2014), lo cual explicaría la menor proporción de linfocitos B de memoria encontrados en el timo de ratones lúpicos (Figura 9B). Por otra parte, se ha descrito la presencia de centros germinales en el timo en distintas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y miastenia gravis (Gatto y cols., 2010; Berrih-Aknin y cols., 2013).

Existen ciertas inmunodeficiencias que han sido sistemáticamente asociadas con enfermedades autoinmunes. Las inmunodeficiencias son producidas por defectos en ciertos genes, los que producen fallas en los mecanismos inmunes. En particular, la inmunodeficiencia de IgA ha sido consistentemente asociada con el lupus (Carneiro-Sampaio y cols., 2008; Singh y cols., 2014). La prevalencia de esta deficiencia en pacientes que desarrollan lupus se ha estimado entre 1 - 4,6% dentro de la población, lo cual es 50 veces superior a la frecuencia descrita para la población en general (Rankin y cols., 1997). La falta de IgA en las mucosas hace susceptible a los individuos a diversos antígenos del ambiente, favoreciendo un estado de activación crónico de linfocitos B y T (Carneiro-Sampaio y cols., 2008). En pacientes con deficiencia en los niveles de IgA se han encontrado auto-anticuerpos capaces de reconocer antígenos propios como cardiolipina, fosfatidilserina y colágeno, entre otros (Yel, 2010). De esta manera, la inmunoglobulina IgA favorece la mantención de la homeostasis y tolerancia (Jacob y cols., 2008).

A raíz de lo anterior estudiamos los linfocitos B de memoria IgA+ en los ratones lúpicos, donde los mayores porcentajes de estas células se encontraron en el ganglio mesentérico y en placas de Peyer (Figura 10C) en forma consistente con la literatura. Si bien encontramos una tendencia al aumento del porcentaje de linfocitos B de memoria IgA+ en estos órganos, el número absoluto de células IgA+ disminuyó

significativamente en las placas de Peyer de ratones lúpicos (Figura 10C), lo cual en base a lo anterior podría contribuir a la inflamación crónica en el intestino.

Los linfocitos B de memoria poseen un repertorio de anticuerpos que ha aumentado la afinidad por el antígeno mediante el proceso de hipermutación somática y modificado el isotipo de inmunoglobulina. Estos eventos ocurren en estructuras específicas dentro de los órganos linfoides, denominadas centros germinales (CGs) (Zotos y Tarlinton, 2012; Oropallo y Cerutti, 2014). Los linfocitos B que conforman estas estructuras expresan los marcadores GL7 y CD95 (Bollig y cols., 2012). Nuestros resultados mostraron un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos B GL7+CD95+ en el bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer de ratones lúpicos y se observó que esta población se compone principalmente de linfocitos B experimentados IgD- (Figura 11). Debido a que los centros germinales son generados producto de la interacción entre células dendríticas foliculares, linfocitos T foliculares y los linfocitos B antígeno específicos (Gatto y cols., 2012), es posible que también exista una desregulación en estos otros tipos celulares, de forma tal que en conjunto mantengan reacciones del centro germinal en forma crónica. Al respecto, en el suero de pacientes lúpicos se ha detectado una producción elevada de CXCL13, quimioquina capaz de reclutar a los linfocitos T foliculares CXCR5+ e inducir la formación de CGs (Wong y cols., 2010). Recientemente se ha planteado que la IL-27 también posee un papel importante en el desarrollo de los centros germinales en el lupus (Redzwan y cols., 2013).

Se ha descrito que en condiciones linfopénicas, como observamos en la mayoría de los órganos linfoides de los ratones lúpicos (excepto en el bazo), existe una mayor disponibilidad de los antígenos y esto facilitaría su reconocimiento por parte de

los linfocitos B, contribuyendo a la formación de centros germinales persistentes y favoreciendo la producción de auto-anticuerpos (Baumjohann y cols., 2013). Los centros germinales pueden surgir espontáneamente en modelos murinos de enfermedades autoinmunes (Vínuesa y cols., 2009), lo cual en conjunto con el proceso de hipermutación somática conduce a la producción de anticuerpos específicos contra antígenos propios con un potencial patogénico (McIntosh y cols., 1996). Dado que los centros germinales son sitios donde ocurre eliminación de restos celulares generados por la apoptosis quedan disponibles auto-antígenos como ADN y ARN, los cuales son reconocidos por los linfocitos B, contribuyendo a la selección de las células más afines por dichos antígenos (Baumann y cols., 2002).

Cabe considerar que los linfocitos B de los centros germinales expresan el marcador CD95, el cual corresponde al receptor de muerte celular Fas, por lo tanto se puede plantear que este mecanismo de inducción de apoptosis en los linfocitos B podría estar desregulado en el lupus, haciéndolos resistentes y promoviendo la sobrevivencia de estas células (Gatto y cols., 2012). De forma similar, en humanos se han identificado pacientes con mutaciones en Fas y se han asociado con el síndrome linfoproliferativo autoinmune (Rieux-Laucat y cols., 1995; Price y cols., 2014). Esta posibilidad no fue explorada en esta tesis.

Como ya hemos mencionado, el proceso de recombinación y cambio de isotipo de inmunoglobulina es importante para la formación de linfocitos B de memoria. Al respecto, estudios recientes han identificado a las moléculas CD39 y CD73 como claves para inducir este proceso (Schena y cols., 2013). Estos marcadores corresponden a ectonucleotidasas que hidrolizan el ATP en tándem y generan adenosina como producto. Su papel ha sido descrito principalmente en la población de

linfocitos T reguladores, donde contribuyen a la supresión de la respuesta inmune (Deaglio y cols., 2007). Por otra parte, ratones *knock out* para CD39 desarrollan en forma espontánea síntomas de enfermedades autoinmunes (Dwyer y cols., 2007; Haskó y cols., 2008), sugiriendo que la presencia de CD39 y CD73 en los linfocitos B puede estar relacionado con una función regulatoria.

Al analizar la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos B de ratones lúpicos encontramos que los linfocitos B vírgenes IgD<sup>+</sup> tienen un fenotipo CD39<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> y dentro de la población de linfocitos B experimentados IgD<sup>-</sup> se encontraron dos poblaciones, una CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> y la otra CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> (Figura 12B). Estos resultados son consistentes con el modelo planteado en la literatura (Schena y cols., 2013), donde los linfocitos B vírgenes son CD39<sup>+</sup> y luego de activarse en presencia del antígeno secretan ATP y expresan CD73, produciendo adenosina. La adenosina actuaría mediante un mecanismo autocrino y de esta forma se induciría el cambio de isotipo en los linfocitos B. En base a esto, los linfocitos B de memoria que mantienen el isotipo IgM tendrían un fenotipo CD39<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup>. En el bazo de ratones lúpicos se observó en forma endógena una disminución en el porcentaje de linfocitos B IgD<sup>-</sup> CD39<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> (Figura 12B) comparado a ratones controles. En este mismo órgano también observamos un aumento en los linfocitos B IgD<sup>-</sup>CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> (Figura 12B) comparado a ratones controles. Esta población no ha sido descrita previamente, sin embargo, podemos plantear que los linfocitos B CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> podrían posteriormente perder la expresión de CD39 y diferenciarse hacia células con fenotipo CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>.

Los linfocitos B de memoria clásicos del bazo de ratón lúpico al ser activados en presencia de CpG y anti-CD40 presentaron un 72% de células CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> (Figura 14B). Saze y cols., 2013 demostraron recientemente que los linfocitos B humanos que

presentan un fenotipo CD39+CD73+ son capaces de hidrolizar ATP exógeno al ser activados *in vitro* e inhibir la proliferación de linfocitos T. Estos resultados sugieren que los linfocitos B de memoria clásicos podrían ejercer un papel inmunosupresor, el cual podría ser defectuoso en el lupus eritematoso sistémico.

Para estudiar el fenotipo de los linfocitos B de memoria en el lupus purificamos las sub-poblaciones de linfocitos B del bazo de un ratón lúpico de acuerdo a la expresión de IgM e IgD, descartando las células dendríticas CD11c+ y los linfocitos B-1 CD5+, los cuales se encuentran aumentados en el lupus (Gleisner y cols., 2013; Crisóstomo, 2014; Fuentes, 2014), y las activamos en presencia de CpG y anti-CD40. Nuestros resultados mostraron que un 77% de los linfocitos B vírgenes al activarse perdieron la expresión de IgD, transformándose en células de memoria IgM+IgD-. Se ha reportado que el suero de pacientes que desarrollan lupus presenta niveles elevados de IL-17 y BAFF (Factor de activación de linfocitos B) en comparación a pacientes sanos y que estas moléculas son capaces de condicionar un estado activado en los linfocitos B, induciendo la expresión de factores de transcripción (Twist-1 y Blimp-1) necesarios para el cambio de isotipo de inmunoglobulina y la diferenciación hacia células plasmáticas (Doreau y cols., 2009). La estimulación basal producida por IL-17 y BAFF podría inducir un estado pre-activado en los linfocitos B vírgenes, facilitando su diferenciación hacia células de memoria IgM+IgD- en el lupus.

Otro factor considerado en este trabajo fue la formación de centros germinales, que son la antesala de la producción de LB de memoria clásicos. Los linfocitos B vírgenes del bazo de un ratón lúpico al activarse presentaron el mayor porcentaje, comparado a las otras sub-poblaciones, de células GL7+CD95+ (48%) que corresponden a linfocitos B de centros germinales. Si bien se ha descrito que en

condiciones normales los linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo no forman centros germinales (Vinuesa y cols., 2009), esta población en el ratón lúpico al ser activada formó un 30% de células GL7+CD95+ (Figura 13), lo cual contribuiría al incremento de los centros germinales observado previamente en ratones lúpicos y a la respuesta de memoria (Figuras 9 y 11).

De los marcadores de activación estudiados en los linfocitos B de ratón lúpico nos pareció interesante CD83. Se ha descrito clásicamente que CD83 es un marcador de co-estimulación expresado principalmente por las células dendríticas, que participa en la inducción de la expresión de CD86 y MHC-II (Tze y cols., 2011). Otros autores han planteado que CD83 expresado en linfocitos T y células dendríticas posee un papel inmunosupresor de la respuesta inmune (Reinwald y cols., 2008; Prazma y Tedder, 2008). Por otra parte, CD83 ha sido descrito como un marcador de activación temprano expresado por los linfocitos B al ser estimulados en presencia de ligandos de TLR, mediante señalización a través del BCR o por interacción con linfocitos T activados (Kretschmer y cols., 2011). Interesantemente, en nuestros resultados, al analizar el fenotipo de linfocitos B de ratón lúpico luego de ser activados encontramos que ninguna sub-población expresó CD83 (Figura 14).

El papel de CD83 en los linfocitos B se ha estudiado en un modelo murino donde los linfocitos B sobre-expresan CD83. Estas células transgénicas al ser activadas en presencia de ligandos de TLR (LPS) presentaron una reducción en la señalización mediada por calcio, disminución en la secreción de inmunoglobulinas y un incremento en la producción de IL-10. Por el contrario, usando un modelo que presenta una mutación con pérdida de función de CD83 se encontró que los linfocitos B presentaron una reducción en la producción de IL-10 y un leve aumento en la

secreción de inmunoglobulinas al ser activados (Kretschmer y cols., 2007). Otros autores confirman que CD83 en los linfocitos B inhibe la señalización del BCR y, por lo tanto, la falta de regulación por parte de esta molécula contribuye a la mantención de un estado activado (Uhde y cols., 2013). A raíz de lo anterior podemos plantear que los linfocitos B en el lupus al no expresar CD83 luego de activarse no poseen el mecanismo para inducir supresión de la respuesta inmune, contribuyendo a un estado de inflamación crónico y a la patogénesis de la enfermedad.

Al analizar la expresión de marcadores de memoria (Bergmann y cols., 2013) en las sub-poblaciones de linfocitos B de ratón lúpico activadas observamos que la población de linfocitos B de memoria clásicos expresó los niveles más altos de CD80 y CD73 (Figura 14), sin embargo, se observó una baja expresión de PD-L2 (proteína de la familia de inmunoglobulinas (B7-DC)). PD-L2 es una molécula descrita principalmente en células dendríticas, la cual puede ejercer una función reguladora de la respuesta inmune, suprimiendo la proliferación de linfocitos T mediante la interacción con PD-1 (Latchman y cols., 2001; Okazaki y Honjo; 2006). En base a lo anterior, la baja expresión de PD-L2 por parte de los linfocitos B de memoria del bazo de ratón lúpico favorecería la ruptura de un mecanismo de tolerancia inmune. De esta forma, se favorecería la mantención de un estado activado de los linfocitos T, los cuales mediante la expresión de CD40L (Quezada y cols., 2004) inducirían la formación de centros germinales, que a su vez generarían más linfocitos B de memoria deficientes en PD-L2, creando un círculo de retroalimentación positiva. De hecho, en pacientes que desarrollan lupus se ha encontrado que los linfocitos T poseen un fenotipo activado y la expresión de CD40L está aumentada (Katsiari y cols., 2002).

Al analizar el patrón de citoquinas producidas por las sub-poblaciones de linfocitos B del bazo de un ratón lúpico activadas se detectó la presencia de IL-6, IL-10 y TNF (Figura 15), en forma similar a lo obtenido con los linfocitos B en el modelo de ratones inmunizados (Figura 5). Los linfocitos B de memoria secretaron IL-10, donde los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> fueron los principales productores, superando el nivel producido por los linfocitos B de memoria clásicos. Los linfocitos B vírgenes produjeron altos niveles de IL-6 y bajos niveles de IL-10. No se observaron diferencias entre las sub-poblaciones en cuanto a la producción de TNF. También se analizó IL-12p70, MCP-1 e IFN- $\gamma$ , pero estas citoquinas no fueron detectadas.

Los linfocitos B se originan en la médula ósea y emigran hacia la periferia en un estadio inmaduro o de transición (TN), ingresan al bazo y allí continúan con su proceso de maduración. Luego estas células dan origen a dos subtipos de linfocitos B-2: los linfocitos B foliculares (FO) y los linfocitos B de la zona marginal (MZ). Los linfocitos B foliculares se caracterizan por recircular en la sangre y los órganos linfoides secundarios, mientras que los linfocitos B marginales residen en la periferia del bazo, denominada también zona marginal (Pillai y cols., 2005; Naradikian y cols., 2014). A diferencia de los linfocitos B foliculares, que poseen un fenotipo IgD<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> y ya sea una alta o baja expresión de IgM, los linfocitos B de la zona marginal expresan altos niveles de IgM y son IgD<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup> (Pillai y cols., 2005). CD21 es el receptor de superficie de la componente del complemento C3d y en asociación con CD19 participa en la activación de los linfocitos B a través del BCR (Kozono y cols., 1998), mientras que CD23 es el receptor de baja afinidad de IgE y participa en la respuesta inmune contra alérgenos (Rosenwasser y Meng, 2005).

Al analizar los linfocitos B de la zona marginal en ratones lúpicos en los diferentes órganos linfoides secundarios encontramos un aumento en relación a ratones controles tanto en porcentaje como en número absoluto, mientras que la proporción de linfocitos B foliculares CD21+CD23+ disminuye (Figura 16B). Este resultado es consistente con lo descrito (Wither y cols., 2000; Sang y cols., 2013) para el modelo murino [NZBW] F1. Una posible explicación es que en la condición de autoinmunidad se produzca un sesgo en la diferenciación de linfocitos B inmaduros o de transición hacia células MZ en desmedro de la población de linfocitos B FO (Pillai y Cariappa, 2009), o bien por otro lado que los linfocitos B FO se diferencien constantemente hacia linfocitos de fenotipo MZ (Srivastava y cols., 2005).

Nuestros resultados muestran que los linfocitos B MZ de ratones lúpicos expresan IgM y CD1d en acuerdo con lo demostrado en la literatura (Duan y cols., 2008), sin embargo, la expresión de estas moléculas fue menor en comparación a ratones controles (Figura 16D y 16E). Dentro de los subtipos de linfocitos T se encuentran los linfocitos NKT, los cuales reconocen antígenos glicolípidicos presentados en el contexto de CD1d (Godfrey y Kronenberg, 2004). Se ha descrito que en ratones lúpicos [NZBW]F1 los linfocitos NKT se encuentran expandidos en el bazo, timo, hígado y riñones y contribuyen a la autoinmunidad (Zeng y cols., 2003; Forestier y cols., 2005). Dado que los linfocitos NKT pueden reconocer antígenos lipídicos presentados por los linfocitos B CD1d+, se ha descrito que esta interacción puede contribuir a la diferenciación de linfocitos B de ratones lúpicos y posterior producción de auto-anticuerpos patogénicos IgM e IgG (Takahashi y Strober, 2008; Cerutti y cols., 2012). De acuerdo a nuestros resultados (Figura 16), la presencia de linfocitos B de

fenotipo MZ en los órganos linfoides secundarios de los ratones lúpicos podría contribuir a la activación de los linfocitos NKT.

Los linfocitos B de la zona marginal, como se mencionó anteriormente, expresan CD1d, poseen un fenotipo IgM+IgD- (Pillai y cols., 2005) y además se ha descrito que poseen ciertas características de linfocitos B de memoria. Estas incluyen un fenotipo pre-activado, la capacidad de auto-renovarse y de sobrevivir por períodos largos, llegando incluso a perdurar por toda la vida del individuo (Pillai y Cariappa, 2009). En humanos se ha descrito que los linfocitos B de memoria IgM+ en la sangre corresponden a los linfocitos B MZ del bazo en circulación (Weller y cols., 2004), los cuales expresan el marcador de memoria CD27 (Ettinger y cols., 2007). En nuestros resultados correlacionamos el fenotipo de linfocitos B de memoria con la producción de IL-10 y observamos que al activar esplenocitos de ratón lúpico la producción de IL-10 se encuentra principalmente delimitada a la población de linfocitos B MZ de fenotipo CD21+CD23- (Figura 17), en forma consistente con lo reportado por Lenert y cols., 2005. Se ha descrito que además de la producción de IL-10, los linfocitos B MZ al activarse pueden producir IL-6, con lo que pueden regular la respuesta inmune o promover inflamación (Brummel y cols., 2005; Barr y cols., 2012). Con estos antecedentes proponemos que los linfocitos B de la zona marginal podrían formar parte del conjunto de linfocitos B de memoria de larga vida que mantienen el isotipo IgM en el lupus.

Debido a que los linfocitos B MZ se ubican en la zona marginal, es decir hacia la periferia del bazo, comprenden la primera barrera frente a los antígenos presentes en el flujo sanguíneo que penetra al órgano. Luego de que se activan estos linfocitos B migran hacia los folículos linfoides, donde pueden recibir la ayuda de los linfocitos T

cooperadores y diferenciarse hacia células plasmáticas o bien activar linfocitos T CD4+, los cuales a su vez pueden activar a los linfocitos B FO (Sang y cols., 2013). La gran expansión de los linfocitos B MZ que observamos en el lupus provoca que estas células comiencen a ubicarse en regiones más allá de la zona marginal, invadiendo los folículos linfoides, cuando normalmente transitan por esa zona temporalmente. La ruptura de este mecanismo de mantención de la tolerancia (exclusión folicular) promueve la inflamación y autoinmunidad (Duan y cols., 2008). Por otra parte, resultados recientes de nuestro laboratorio muestran un aumento de células dendríticas plasmacitoides (pDCs) en el bazo de ratones lúpicos, las que al activarse producen IFN- $\alpha$  (Gleisner y cols., 2013). El IFN- $\alpha$  a su vez induce la activación de los linfocitos B MZ y la producción de auto-anticuerpos (Lenert y cols., 2006).



## RESUMEN DE RESULTADOS

### Caracterización de los linfocitos B de memoria murinos (modelo de ratones inmunizados)

- Los linfocitos B de memoria están presentes en todos los órganos linfoides analizados: bazo, ganglio mesentérico, ganglios periféricos, placas de Peyer y timo.
- Tal como se ha descrito en la literatura, en este estudio corroboramos que existen dos sub-poblaciones de linfocitos B de memoria: los linfocitos B de memoria clásicos (IgM-IgD-) y los linfocitos B de memoria IgM+ de larga vida.
- Los linfocitos B de memoria activados *in vitro* producen IL-10, IL-6 y TNF. Los linfocitos B de memoria IgM+ producen un mayor nivel de IL-10 e IL-6 que los linfocitos B de memoria clásicos.
- Los linfocitos B de memoria clásicos, a diferencia de los linfocitos B vírgenes, activados *in vitro* expresan CD80, CD73 y PD-L2, marcadores asociados a memoria. Los linfocitos B de memoria IgM+ expresan menores niveles de estas moléculas.

### Linfocitos B de memoria en el lupus

- Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B totales en los órganos linfoides (bazo, timo, ganglios periféricos, ganglio mesentérico y placas de Peyer) en comparación a ratones controles, con diferencias significativas en ganglios periféricos y en el timo.
- Los ratones lúpicos presentan un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos B de memoria clásicos en el bazo en comparación a ratones controles,

mientras que los linfocitos B de memoria IgM+ no presentaron diferencias significativas en este órgano.

- En ganglio mesentérico, placas de Peyer y ganglios periféricos de ratones lúpicos existe una tendencia al aumento del porcentaje de los linfocitos B de memoria IgM+ en comparación a ratones controles, con diferencias significativas en ganglios periféricos.
- En el timo de ratones lúpicos, el porcentaje de los linfocitos B de memoria clásicos disminuye mientras que los porcentajes de los linfocitos B de memoria IgM+ y linfocitos B vírgenes aumentan en comparación a ratones controles.
- Los ratones lúpicos presentan una disminución significativa del número absoluto de linfocitos B de memoria IgA+ en ganglio mesentérico y placas de Peyer comparado a ratones controles.
- Los ratones lúpicos comparados a ratones controles poseen un mayor porcentaje de linfocitos B de centros germinales en los órganos linfoides secundarios, los cuales además muestran una alta proporción de linfocitos B de memoria IgD-.
- Los ratones lúpicos poseen un mayor porcentaje de linfocitos B CD73+ en el bazo y en ganglios periféricos en comparación a ratones controles.
- Los linfocitos B de memoria de ratón lúpico al activarse producen IL-10, IL-6 y TNF. La producción de IL-10 está dada principalmente por los linfocitos B de memoria IgM+.
- Los linfocitos B de memoria clásicos de un ratón lúpico al activarse expresan elevados niveles de CD80 y CD73 en comparación a los linfocitos B de

memoria IgM+, pero bajos niveles de PD-L2 a diferencia de lo que ocurre con los linfocitos B de memoria clásicos de ratones inmunizados.

- Los ratones lúpicos presentan un aumento en el porcentaje de linfocitos B de la zona marginal CD21+CD23 en los órganos linfoides secundarios en comparación a ratones controles.
- La producción de IL-10 en ratones lúpicos y controles está limitada principalmente a la población de linfocitos B de la zona marginal CD21+CD23- lo que concuerda con características de linfocitos B de memoria IgM+.

## CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que en los órganos linfoides secundarios de ratones lúpicos existe un incremento anormal de linfocitos B de la zona marginal y formación exacerbada de centros germinales, lo cual conduce a la generación de una elevada proporción de linfocitos B de memoria IgM+ y clásicos, respectivamente. Estos factores y la baja expresión de PD-L2, molécula asociada a la inducción de tolerancia, en los linfocitos B de memoria clásicos podrían favorecer la formación de auto-anticuerpos y contribuir a la patogénesis del lupus.

## REFERENCIAS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, S. Pillai. (2008). Propiedades generales de las respuestas inmunitarias. Inmunología celular y molecular. 6ta edición. Elsevier, Madrid. Pág. 3-19.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T., y Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *The FASEB Journal*, 4(11), 2860-2867.
- Anderson, S. M., Tomayko, M. M., Ahuja, A., Haberman, A. M., & Shlomchik, M. J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *The Journal of experimental medicine*, 204(9), 2103-2114.
- Anolik, J. H., Barnard, J., Cappione, A., Pugh-Bernard, A. E., Felgar, R. E., Looney, R. J., & Sanz, I. (2004). Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 50(11), 3580-3590.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 19(6), 355-367.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brie, F., Galizzi, J. P., Van Kooten, C., ... & Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annual review of immunology*, 12(1), 881-926.
- Barnett, L. G., Simkins, H. M., Barnett, B. E., Korn, L. L., Johnson, A. L., Wherry, E. J., ... & Laufer, T. M. (2014). B Cell Antigen Presentation in the Initiation of Follicular Helper T Cell and Germinal Center Differentiation. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3607-3617.
- Barr, T. A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., ... & Gray, D. (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of experimental medicine*, 209(5), 1001-1010.
- Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R. E., Manger, B., Gaipl, U., Neuhuber, W. L., ... & Herrmann, M. (2002). Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 46(1), 191-201.
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K. M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity*, 38(3), 596-605.
- Bergmann, B., Grimsholm, O., Thorarinsdottir, K., Ren, W., Jirholt, P., Gjertsson, I., & Mårtensson, I. L. (2013). Memory B cells in mouse models. *Scandinavian journal of immunology*, 78(2), 149-156.
- Bevan, M. J. (2011). Understand memory, design better vaccines. *Nature immunology*, 12(6), 463.
- Berrih-Aknin, S., Ragheb, S., Le Panse, R., & Lisak, R. P. (2013). Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis. *Autoimmunity reviews*, 12(9), 885-893.
- Black, S. J., Tokuhisa, T., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1980). Memory B cells at successive stages of differentiation: expression of surface IgD and capacity for self renewal. *European journal of immunology*, 10(11), 846-851.

- Bollig, N., Brüstle, A., Kellner, K., Ackermann, W., Abass, E., Raifer, H., ... & Lohoff, M. (2012). Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8664-8669.
- Bouaziz, J. D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., & Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *European journal of immunology*, 40(10), 2686-2691.
- Brummel, R., & Lenert, P. (2005). Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A (D) CpG-oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 174(4), 2429-2434.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development 1. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 55-79.
- Cappione, A., Anolik, J. H., Pugh-Bernard, A., Barnard, J., Dutcher, P., Silverman, G., & Sanz, I. (2005). Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 3205-3216.
- Carneiro-Sampaio, M., Liphaut, B. L., Jesus, A. A., Silva, C. A. A., Oliveira, J. B., & Kiss, M. H. (2008). Understanding systemic lupus erythematosus physiopathology in the light of primary immunodeficiencies. *Journal of clinical immunology*, 28(1), 34-41.
- Carsetti, Rita, M. Manuela Rosado, and Hedda Wardmann. "Peripheral development of B cells in mouse and man." *Immunological reviews* 197.1 (2004): 179-191.
- Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2012). Activation of B cells by non-canonical helper signals. *EMBO reports*, 13(9), 798-810.
- Cho, S. H., Raybuck, A., Wei, M., Erickson, J., Nam, K. T., Cox, R. G., ... & Boothby, M. (2013). B Cell–Intrinsic and–Extrinsic Regulation of Antibody Responses by PARP14, an Intracellular (ADP-Ribosyl) Transferase. *The Journal of Immunology*, 191(6), 3169-3178.
- Craft, J. E. (2012). Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(6), 337-347.
- Crisóstomo, N. (2014). Papel de las células dendríticas en el establecimiento de autoinmunidad en el lupus. Tesis de magíster en ciencias biológicas. Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., ... & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), 1257-1265.
- Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 1-22.
- Ding, C., Cai, Y., Marroquin, J., Ildstad, S. T., & Yan, J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *The Journal of Immunology*, 183(11), 7140-7149.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., ... & Weill, J. C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*, 10(12), 1292-1299.

- Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M. C., Ranchin, B., ... & Bonnefoy-Bérard, N. (2009). Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature immunology*, 10(7), 778-785.
- Duan, B., Niu, H., Xu, Z., Sharpe, A. H., Croker, B. P., Sobel, E. S., & Morel, L. (2008). Intrafollicular location of marginal zone/CD1dhi B cells is associated with autoimmune pathology in a mouse model of lupus. *Laboratory investigation*, 88(9), 1008-1020.
- Dwyer, K. M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling*, 3(1-2), 171-180.
- Feng, X., Wang, D., Chen, J., Lu, L., Hua, B., Li, X., ... & Sun, L. (2012). Inhibition of aberrant circulating Tfh cell proportions by corticosteroids in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS one*, 7(12), e51982.
- Forestier, C., Molano, A., Im, J. S., Dutronc, Y., Diamond, B., Davidson, A., ... & Porcelli, S. A. (2005). Expansion and hyperactivity of CD1d-restricted NKT cells during the progression of systemic lupus erythematosus in (New Zealand Black × New Zealand White) F1 mice. *The Journal of Immunology*, 175(2), 763-770.
- Fuentes, C. (2014). Participación de distintas poblaciones de linfocitos B en el desarrollo del Lupus Sistémico Eritematoso. Tesis de magíster en ciencias biológicas. Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Gallagher, E., Enzler, T., Matsuzawa, A., Anzelon-Mills, A., Otero, D., Holzer, R., ... & Karin, M. (2006). Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nature immunology*, 8(1), 57-63.
- Gatto, D., & Brink, R. (2010). The germinal center reaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(5), 898-907.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., & Weigert, M. (2011). Receptor Editing: An Approach by Autoreactive B Cells to Escape Tolerance. *The Journal of immunology*, 186(3), 1303-1312.
- Gleisner, M. A., Reyes, P., Alfaro, J., Solanes, P., Simon, V., Crisostomo, N., ... & Bono, M. R. (2013). Dendritic and stromal cells from the spleen of lupic mice present phenotypic and functional abnormalities. *Molecular immunology*, 54(3), 423-434.....
- Godfrey, D. I., & Kronenberg, M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation*, 114(10), 1379-1388.
- Good-Jacobson, K. L., Song, E., Anderson, S., Sharpe, A. H., & Shlomchik, M. J. (2012). CD80 expression on B cells regulates murine T follicular helper development, germinal center B cell survival, and plasma cell generation. *The Journal of Immunology*, 188(9), 4217-4225.
- Griffin, D. O., Holodick, N. E., & Rothstein, T. L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *The Journal of experimental medicine*, 208(1), 67-80.
- Gururajan, M., Sindhava, V. J., & Bondada, S. (2014). B Cell Tolerance in Health and Disease. *Antibodies*, 3(1), 116-129.

- Hahn, B. H. y Wallace D. J. (2012). THE PATHOGENESIS OF LUPUS. *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes: Expert Consult-Online*. Octava edición. Ed. Elsevier. pág.25-34.
- Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2012). Positive and negative selection of natural autoreactive B cells. In *Naturally Occurring Antibodies (NABs)* (pp. 227-238). Springer New York.
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 759-770.
- Heine, G., Drozdenko, G., Grün, J. R., Chang, H. D., Radbruch, A., & Worm, M. (2014). Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM-or IgG-secreting plasmablasts. *European journal of immunology*. 44: 1615-1621.
- Hidalgo Y., Vargas L., Morales MJ., Roseblatt M., Bono MR. "Characterization of different B cell populations generated after immunization" Póster presentado en la XXVI Reunión Annual Sociedad de Biología Celular de Chile. 23-27 Octubre 2012. Puerto Varas, Chile.
- Hodge, D. L., Reynolds, D., Cerbán, F. M., Correa, S. G., Baez, N. S., Young, H. A., & Rodriguez-Galan, M. C. (2012). MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes. *European journal of immunology*, 42(10), 2644-2654.
- Hodge, D., Berthel, C., Coppola, V., Shirota, H., Reynolds, D., Klinman, D., & Young, H. (2012). Loss of IFN-gamma 3'untranslated region AU-rich element affects B220+ B cell and plasmacytoid dendritic cell populations in novel murine lupus model. *The Journal of Immunology*, 188, 161-3.
- Hou, B., Saudan, P., Ott, G., Wheeler, M. L., Ji, M., Kuzmich, L., ... & DeFranco, A. L. (2011). Selective utilization of Toll-like receptor and MyD88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity*, 34(3), 375-384.
- Jacob, C. M., Pastorino, A. C., Fahi, K., Carneiro-Sampaio, M., & Monteiro, R. C. (2008). Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *Journal of clinical immunology*, 28(1), 56-61.
- Jacobi, A. M., Odendahl, M., Reiter, K., Bruns, A., Burmester, G. R., Radbruch, A., ... & Dörner, T. (2003). Correlation between circulating CD27<sup>high</sup> plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 48(5), 1332-1342.
- Jacobi, A. M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C., & Diamond, B. (2009). Phenotypic characterization of autoreactive B cells—checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*, 4(6), e5776.
- Katsiari, C. G., Liossis, S. N., Dimopoulos, A. M., Charalambopoulos, D. V., Mavrikakis, M., & Sfikakis, P. P. (2002). CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition. *Lupus*, 11(6), 370-378.
- Klein, U., Küppers, R., & Rajewsky, K. (1997). Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*, 89(4), 1288-1298.
- Klein, U., Rajewsky, K., & Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig) M+ IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable

- region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *The Journal of experimental medicine*, 188(9), 1679-1689.
- Kono, D. H., Haraldsson, M. K., Lawson, B. R., Pollard, K. M., Koh, Y. T., Du, X., ... & Theofilopoulos, A. N. (2009). Endosomal TLR signaling is required for anti-nucleic acid and rheumatoid factor autoantibodies in lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29), 12061-12066.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27, 485-517.
- Kozono Y, Abe R, Kozono H, Kelly RG, Azuma T, and Holers VM. (1998). Cross-linking CD21/CD35 or CD19 increases both B7-1 and B7-2 expression on murine splenic B cells. *Journal of Immunology*. 160: 1565-1572.
- Kretschmer, B., Kühl, S., Fleischer, B., & Breloer, M. (2011). Activated T cells induce rapid CD83 expression on B cells by engagement of CD40. *Immunology letters*, 136(2), 221-227.
- Kretschmer, B., Lüthje, K., Guse, A. H., Ehrlich, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., ... & Breloer, M. (2007). CD83 modulates B cell function in vitro: increased IL-10 and reduced Ig secretion by CD83Tg B cells. *PloS one*, 2(8), e755.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., ... & Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549.
- Kurosaki, T., Aiba, Y., Kometani, K., Moriyama, S., & Takahashi, Y. (2010). Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunological reviews*, 237(1), 104-116.
- Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Neves, P., Shen, P., Stervbo, U., ... & Fillatreau, S. (2010). Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunological reviews*, 233(1), 146-161.
- Lane, P., Brocker, T., Hubele, S., Padovan, E., Lanzavecchia, A., & McConnell, F. (1993). Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), 1209-1213.
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., ... & Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*, 2(3), 261-268.
- Lenert, P. S. (2006). Targeting Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells and autoreactive B cells as a therapy for lupus. *Arthritis Research and Therapy*, 8(1), 203.
- Lenert, P., Brummel, R., Field, E. H., & Ashman, R. F. (2005). 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.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., & Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology*, 14(1), 233-258.

- Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M., & Gershwin, M. E. (2010). Definition of human autoimmunity—autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 9(5), A259-A266.
- Luc, S., Luis, T. C., Boukarabila, H., Macaulay, I. C., Buza-Vidas, N., Bouriez-Jones, T., ... & Jacobsen, S. E. W. (2012). The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nature immunology*, 13(4), 412-419.
- Lund, F. E. (2008). Cytokine-producing B lymphocytes—key regulators of immunity. *Current opinion in immunology*, 20(3), 332-338.
- Luning-Prak, E. T., Monestier, M., & Eisenberg, R. A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), 96-121.
- Macaulay, A. E., DeKruyff, R. H., Goodnow, C. C., & Umetsu, D. T. (1997). Antigen-specific B cells preferentially induce CD4+ T cells to produce IL-4. *The Journal of Immunology*, 158(9), 4171-4179.
- Mathian, A., Gallegos, M., Pascual, V., Banchereau, J., & Koutouzov, S. (2011). Interferon- $\alpha$  induces unabated production of short-lived plasma cells in pre-autoimmune lupus-prone (NZB $\times$  NZW) F1 mice but not in BALB/c mice. *European journal of immunology*, 41(3), 863-872.
- Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, 30, 221-241.
- McIntosh, R. S., Asghar, M. S., Watson, P. F., Kemp, E. H., & Weetman, A. P. (1996). Cloning and analysis of IgG kappa and IgG lambda anti-thyroglobulin autoantibodies from a patient with Hashimoto's thyroiditis: evidence for in vivo antigen-driven repertoire selection. *The Journal of Immunology*, 157(2), 927-935.
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 606-616.
- Miller, J. P., Stadanlick, J. E., & Cancro, M. P. (2006). Space, selection, and surveillance: setting boundaries with B<sub>1</sub>L<sub>y</sub>S. *The Journal of Immunology*, 176(11), 6405-6410.
- Montecino-Rodriguez, E., & Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*, 36(1), 13-21.
- Moresco, E. M. Y., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*, 21(13), 488-493.
- Moroni, L., Bianchi, I., & Lleo, A. (2012). Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 11(6), A386-A392.
- Muñoz, L. E., Janko, C., Schulze, C., Schorn, C., Sarter, K., Schett, G., & Herrmann, M. (2010). Autoimmunity and chronic inflammation—two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmunity reviews*, 10(1), 38-42.
- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., ... & Kozutsumi, Y. (2007). Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-

- glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Molecular and cellular biology*, 27(8), 3008-3022.
- Naradikian, M. S., Scholz, J. L., Oropallo, M. A., & Cancro, M. P. (2014). Understanding B Cell Biology. In *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases* (pp. 11-35). Springer Basel.
- Nutt, S. L., & Kee, B. L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*, 26(6), 715-725.
- Obermoser, G., & Pascual, V. (2010). The interferon- $\alpha$  signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19(9), 1012-1019.
- Okazaki, T., & Honjo, T. (2006). The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology*, 27(4), 195-201.
- Oropallo, M. A., & Cerutti, A. (2014). Germinal center reaction: antigen affinity and presentation explain it all. *Trends in Immunology*, 35(7), 287-289.
- Pape, K. A., Taylor, J. J., Maul, R. W., Gearhart, P. J., & Jenkins, M. K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science*, 331(6021), 1203-1207.
- Parham, P. (2006). Manipulación de la respuesta inmunitaria. *Inmunología*. 2da edición. Ed. Médica Panamericana, Madrid. Pág. 416-419.
- Perera, J., Meng, L., Meng, F., & Huang, H. (2013). Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), 17011-17016.
- Pillai, S., & Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 767-777.
- Pillai, S., Cariappa, A., & Moran, S. T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 161-196.
- Pisitkun, P., Deane, J. A., Difilippantonio, M. J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A. B., & Bolland, S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*, 312(5780), 1669-1672.
- Prazma, C. M., & Tedder, T. F. (2008). Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander?. *Immunology letters*, 115(1), 1-8.
- Preud'homme, J. L., Petit, I., Barra, A., Morel, J. C. L., & Lelièvre, E. (2000). Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Molecular immunology*, 37(15), 871-887.
- Price, S., Shaw, P. A., Seitz, A., Joshi, G., Davis, J., Niemela, J. E., ... & Lenardo, M. J. (2014). Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood*, 123(13), 1989-1999.
- Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F., & Noelle, R. J. (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 307-328.
- Rankin, E. C. C., & Isenberg, D. A. (1997). IgA deficiency and SLE: prevalence in a clinic population and a review of the literature. *Lupus*, 6(4), 390-394.

- Redzwan, N. M., Vijayan, D., Ma, C., Tangye, S., Brink, R., Vinuesa, C., & Batten, M. (2013). 207: IL-27 signals to both B and T cells support germinal center function and the development of GC-driven lupus. *Cytokine*, 63(3), 292.
- Reinwald, S., Wiethé, C., Westendorf, A. M., Breloer, M., Probst-Kepper, M., Fleischer, B., ... & Hansen, W. (2008). CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 180(9), 5890-5897.
- Rekvig, O. P., Putterman, C., Casu, C., Gao, H. X., Ghirardello, A., Mortensen, E. S., ... & Doria, A. (2012). Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders?. *Autoimmunity reviews*, 11(8), 596-603.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C. E. A., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., & De Villartay, J. P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, 268(5215), 1347-1349.
- Rosenwasser, L. J., & Meng, J. (2005). Anti-CD23. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 29(1), 61-72.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., & Ahmed, R. (2010). From vaccines to memory and back. *Immunity*, 33(4), 451-463.
- Sang, A., Zheng, Y. Y., & Morel, L. (2013). Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Molecular immunology*. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.013. Artículo en proceso de publicación.
- Saze, Z., Schuler, P. J., Hong, C. S., Cheng, D., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, 122(1), 9-18.
- Schena, F., Volpi, S., Faliti, C. E., Penco, F., Santi, S., Proietti, M., ... & Traggiai, E. (2013). Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. *Cell reports*, 3(6), 1824-1831.
- Scholz, J. L., Oropallo, M. A., Sindhava, V., Goenka, R., & Cancro, M. P. (2013). The role of B lymphocyte stimulator in B cell biology: implications for the treatment of lupus. *Lupus*, 22(4), 350-360.
- Sears, C., Lin, J., Berman, A., & Sadiq, S. (2014). B Cell Subsets in the Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients (P4. 134). *Neurology*, 82(10 Supplement), P4-134.
- Shlomchik, M. J., & Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological reviews*, 247(1), 52-63.
- Sims, G. P., Robbins, R., Withers, D., Fischer, R. T., Grammer, A. C., ... & Lipsky, P. E. (2007). IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *The Journal of Immunology*, 178(5), 2872-2882.
- Singh, K., Chang, C., & Gershwin, M. E. (2014). IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 13(2), 163-177.

- Singh-Jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier, M. C., Bessis, N., Rammensee, H. G., & Decker, P. (2013). The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*, 218(1), 28-39.
- Srivastava, B., Quinn, W. J., Hazard, K., Erikson, J., & Allman, D. (2005). Characterization of marginal zone B cell precursors. *The Journal of experimental medicine*, 202(9), 1225-1234.
- Takahashi, T., & Strober, S. (2008). Natural killer T cells and innate immune B cells from lupus-prone NZB/W mice interact to generate IgM and IgG autoantibodies. *European journal of immunology*, 38(1), 156-165.
- Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary?. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 785-790.
- Taylor, J. J., Jenkins, M. K., & Pape, K. A. (2012). Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. *Trends in immunology*, 33(12), 590-597.
- Taylor, J. J., Pape, K. A., & Jenkins, M. K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *The Journal of experimental medicine*, 209(3), 597-606.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., & Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), 1009-1020.
- Tomayko, M. M., Steinle, N. C., Anderson, S. M., & Shlomchik, M. J. (2010). Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *The Journal of Immunology*, 185(12), 7146-7150.
- Townsend, M. J., Monroe, J. G., & Chan, A. C. (2010). B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunological reviews*, 237(1), 264-283.
- Tsuji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M. C., & Wardemann, H. (2006). A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *The Journal of experimental medicine*, 203(2), 393-400.
- Tze, L. E., Horikawa, K., Domaschensz, H., Howard, D. R., Roots, C. M., Rigby, R. J., ... & Goodnow, C. C. (2011). CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *The Journal of experimental medicine*, 208(1), 149-165.
- Uhde, M., Kuehl, S., Richardt, U., Fleischer, B., & Osterloh, A. (2013). Differential regulation of marginal zone and follicular B cell responses by CD83. *International immunology*, 25(9), 507-520.
- Vinuesa, C. G., Sanz, I., & Cook, M. C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(12), 845-857.
- Walters, S. N., Webster, K. E., Daley, S., & Grey, S. T. (2014). A Role for Intrathymic B Cells in the Generation of Natural Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 1302519.
- Weill, J. C., Le Gallou, S., Hao, Y., & Reynaud, C. A. (2013). Multiple players in mouse B cell memory. *Current opinion in immunology*, 25(3), 334-338.

- Weinstein, P. D., & Cebra, J. J. (1991). The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *The Journal of Immunology*, *147*(12), 4126-4135.
- Weller, S., Braun, M. C., Tan, B. K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M. E., ... & Weill, J. C. (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*, *104*(12), 3647-3654.
- Wither, J. E., Paterson, A. D., & Vukusic, B. (2000). Genetic dissection of B cell traits in New Zealand black mice. The expanded population of B cells expressing up-regulated costimulatory molecules shows linkage to Nba2. *European journal of immunology*, *30*(2), 356-365.
- Wong, C. K., Wong, P. T., Tam, L. S., Li, E. K., Chen, D. P., & Lam, C. W. (2010). Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *Journal of clinical immunology*, *30*(1), 45-52.
- Xiao, Y., Hendriks, J., Langerak, P., Jacobs, H., & Borst, J. (2004). CD27 is acquired by primed B cells at the centroblast stage and promotes germinal center formation. *The Journal of Immunology*, *172*(12), 7432-7441.
- Yates, Jennifer L., et al. "T Cell-Dependent IgM Memory B Cells Generated during Bacterial Infection Are Required for IgG Responses to Antigen Challenge." *The Journal of Immunology* *191*.3 (2013): 1240-1249.
- Yel, L. (2010). Selective IgA deficiency. *Journal of clinical immunology*, *30*(1), 10-16.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., & Nussenzweig, M. C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*, *201*(5), 703-711.
- Yurasov, S., Tiller, T., Tsuiji, M., Velinzon, K., Pascual, V., Wardemann, H., & Nussenzweig, M. C. (2006). Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *The Journal of experimental medicine*, *203*(10), 2255-2261.
- Zaheen, A., Boulianne, B., Parsa, J. Y., Ramachandran, S., Gommerman, J. L., & Martin, A. (2009). AID constrains germinal center size by rendering B cells susceptible to apoptosis. *Blood*, *114*(3), 547-554.
- Zeng, D., Liu, Y., Sidobre, S., Kronenberg, M., & Strober, S. (2003). Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(8), 1211-1222.
- Zhang, Y., Schreiber, T. H., & Rosenblatt, J. D. (2014). The Role of B Cells in Shaping the Antitumor Immune Response. In *Advances in Tumor Immunology and Immunotherapy* (pp. 19-35). Springer New York.
- Zlotoff, D. A., Sambandam, A., Logan, T. D., Bell, J. J., Schwarz, B. A., & Bhandoola, A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*, *115*(10), 1897-1905.
- Zotos, D., & Tarlinton, D. M. (2012). Determining germinal centre B cell fate. *Trends in immunology*, *33*(6), 281-288.

Zuccarino-Catania, G. V., Sadanand, S., Weisel, F. J., Tomayko, M. M., Meng, H., Kleinstein, S. H., ... & Shlomchik, M. J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nature Immunology*.