

UCH-FC
MAG-B
#954
C1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO

***“Participación de distintas poblaciones de linfocitos B
en el desarrollo del 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

Camila Alejandra Fuentes Villegas

Director de Tesis:
Dra. María Rosa Bono

Codirector de Tesis:
Dr. Mario Rosemblatt

Diciembre 2014
Santiago - Chile

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que la tesis de magíster, presentado por la candidata

SRTA. CAMILA ALEJANDRA FUENTES VILLEGAS.

“Participación de distintas poblaciones de linfocitos B en el desarrollo del Lupus Eritematoso Sistémico”

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día Martes 14 de Octubre de 2014.

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título


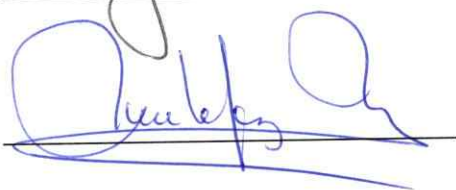



Dr. Mario Rosemblatt Silber
Co-Director Seminario de Título



Comisión de Evaluación

Dr. Miguel Allende
Presidente Comisión

Dra. Mercedes López
Correctora

Santiago de Chile, Diciembre de 2014

"If you are not failing every now and again, It's a sign you're not doing
anything very innovative."

Woody Allen

BIOGRAFIA



Nací el 16 de Julio de 1984 en la linda ciudad de Concepción. Mis primeros años de colegio los hice en el Trehela's English School, donde guardo lindos recuerdos a pesar de solo haber estado unos pocos años. En tercero básico me cambiaron al que sería finalmente mi colegio de la vida, el Wenlock School. Mi paso por el Wenlock no fue fácil, pero mirándolo ahora con distancia esos años me ayudaron a crecer y a forjar mi carácter.

Desde chica supe que me gustaba la biología y en particular la genética. Así decidí que aunque todos apostaban a que sería doctora, lo mío era la biotecnología, una carrera que en ese tiempo era bastante desconocida.

Me tocó ser la última generación en dar la ya extinta PAA, para mi sorpresa sin los resultados esperados pues quedé en lista de espera. Así la vida me daba la primera de muchas lecciones. Pero hoy no puedo estar más que agradecida porque terminé ingresando a Bachillerato en Ciencias Naturales y Exactas en la Universidad de Chile, siempre con Biotecnología en mente. El paso por Bachi es una de las mejores cosas que me han pasado, dejando como resultado grandes amistades que perduran hasta el día de hoy. Al terminar el primer año decidí reintentarlo y me senté a dar la PSU. Así logré ingresar a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Después de un largo camino logré completar esa tarea para posteriormente decidirme a continuar estudiando y obtener un postgrado. Así decidí ingresar a hacer el Magíster en Ciencias Biológicas y seguir aprendiendo.

Han sido varios años de mucho esfuerzo y duras lecciones. Momentos malos, momentos pésimos, pero también momentos inmensamente felices donde he visto frutos. Ahora a continuar el camino y ver que nos depara el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas personas las que pasan por mi mente, tanto que agradecer y espero de corazón sepan que sin ellos esta etapa hubiera sido aún más difícil.

Primero, mi pequeña familia. Mis papitos lindos, ustedes han sido fundamentales, les estaré eternamente agradecida. A mi Antonia, por ser la fuente de muchas alegrías. Gracias a todos quienes considero mi familia porque sin ustedes no sería lo que soy. También. a mi familia gringa que aunque están lejos siempre me tienen presente y yo a ellos. A mi primi querida, gracias por siempre tener orejas para mí.

Segundo, al InmunoLab. Gracias a cada uno de los que de alguna manera me ayudó durante este largo tiempo que hemos compartido. Especialmente quiero agradecer a mis tutores. Dra. María Rosa Bono y Dr. Mario Roseblatt, les agradezco profundamente el apoyo que me han dado. Gracias por ayudarme a creer en mi misma. Gracias Leito por enseñarme tanto, por la paciencia, los oídos y los buenos consejos. Gracias Dani, por tus enseñanzas y por ayudarme tantas veces. Gracias a la ahora Dra. Gabriela Tejón, amiga me enorgullece mucho ver cómo has progresado. Espero este sea el inicio de grandes cosas para ti. Gracias Yessia, por tantas horas de orejas y atención. Gracias a cada uno de los que ha formado parte del querido Inmunolab; Felipe, Domi, Vale, Coté, Pame, Zoila y Óscar, les estaré eternamente agradecida. Y por último, gracias a la Ale y en especial a mi compañera de tantas horas frente al citómetro; Nati esta tesis no hubiera sido lo mismo sin ti, muchas gracias.

Finalmente debo agradecer a mis amigos de la U, gracias por tantos momentos jugosos que hemos compartido. En especial a uno quien ahora guarda un lugar especial ahora y siempre.

Mención especial quiero hacer a todos mis "bichos" que dieron su vida para que esta tesis fuera posible. Me esforcé al máximo para que la vida de cada uno no se perdiera en vano.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo se realizó gracias a:

- Beca CONICYT de magíster nacional Convocatoria 2012
- Proyectos FONDECYT 1100557 y 1140431
- Proyecto Basal, PBF-16

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCION	1
1.1. LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO	1
1.2. AUTOANTICUERPOS Y LUPUS	1
1.3. LINFOCITOS B Y LUPUS	2
1.4. LINFOCITOS B, LUPUS E INFECCIONES	9
1.5. LINFOCITOS B TÍMICOS	12
1.6. LINFOCITOS B Y CÉLULAS DENDRITICAS	14
1.7. MODELO MURINO BWF1	15
2. HIPOTESIS	16
3. OBJETIVO GENERAL	17
3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5. RESULTADOS	31
5.1. Alteraciones en la población de Linfocitos B de bazo durante el desarrollo del lupus	31
4.2. Linfocitos B tímicos presentan alteraciones durante el desarrollo del lupus	49
4.3. Transferencia adoptiva de DC de bazo lúpicas o controles a ratones prelúpicas	59
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSIONES	77
7. BIBLIOGRAFIA	78
8. ANEXOS	91
Figura Suplementaria 1. Expresión de PD-L1, CD86, PD-L2 y MHC-II en LB de bazo de ratones lúpicas	91

Figura suplementaria 2. Linfocitos B de bazo de ratones lúpicos expresan Siglec-G	92
Figura suplementaria 3. Expresión de GL7 en LB de bazo de ratones lúpicos.	93
Figura suplementaria 4. Linfocitos B reguladores de bazo de ratones lúpicos expresan CD86, PD-L1, MHC-II (IAd) y PD-L2	94
Figura suplementaria 5. Expresión de MHC II (IAd) en linfocitos B tímicos de ratones lúpicos	95
Figura suplementaria 6. Presencia de células plasmáticas en el timo de ratones lúpicos	96
Figura suplementaria 7. Expresión de GL7 en linfocitos B de timo de ratones Lúpicos.	97
Figura suplementaria 8. Fenotipo de los Timocitos de ratones controles viejos NZW/Balb/c depletados de APC.	98
Figura suplementaria 9. Linfocitos B tímicos de ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan una disminución en la expresión de MHC-II (IAd).	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización sub-celular y especificidad de los distintos TLRs (Anders y col., 2005)	11
Figura 2. Metodología del experimento de transferencia adoptiva de DC de ratón lúpico o control en un ratón prelúpico.	29
Figura 3. Ratones lúpicos presentan esplenomegalia y un aumento en LB en el bazo en comparación a ratones prelúpicos.	33
Figura 4. Subpoblaciones de Linfocitos B en el bazo de ratones controles jóvenes, prelúpicos, controles viejos y lúpicos	36
Figura 5. Ratones lúpicos presentan células plasmáticas en el bazo	37
Figura 6. El bazo de ratones lúpicos presentan LB que expresan CD5 y linfocitos B reguladores CD1dhiCD5+.	40
Figura 7. Los ratones lúpicos presentan LB productores de IL-10 en el bazo	42
Figura 8. Correlación entre LB productores de IL-10 y de LB que expresan CD5 en el bazo de ratones lúpicos.	44
Figura 9. Fenotipo de la purificación de LB de ratones lúpicos y	45

controles NZW/Balb/c previo a la activación con ligandos de TLR.

Figura 10. Linfocitos B de bazo de ratones control y lúpicos presentan similares niveles de expresión de CD40 y CD86 luego de 24/48hrs de activación con distintos ligandos para TLR. 46

Figura 11. Linfocitos B de bazo de ratones control y lúpicos presentan similares niveles de producción de citoquinas luego de 24/48 hrs de activación con distintos ligandos para TLR 48

Figura 12. Disminución de la celularidad y aumento en el porcentaje de LB de timo de ratones lúpicos. 50

Figura 13. En el timo de ratones lúpicos existen poblaciones de LB que no expresan CD5. 51

Figura 14. Subpoblaciones de Linfocitos B en el timo de ratones controles jóvenes, prelúpicos, controles viejos y lúpicos 54

Figura 15. Timos de ratones lúpicos carecen de timocitos CD4+CD8+DP 55

Figura 16. Linfocitos B de timo como de bazo lúpicos presentan una interacción similar con timocitos control. 57

Figura 17. Linfocitos B de timo como de bazo lúpicos poseen la capacidad de inducir un aumento en los Tregs a partir de Timocitos depletados de APC	58
Figura 18. La transferencia adoptiva de DC provenientes de ratones lúpicos induce un aumento en la producción de auto-anticuerpos en ratones prelúpicos.	60
Figura 19. Linfocitos B de bazo de ratones inyectados con DC lúpicas presentan un mayor estado de activación y una menor expresión de MHC-II	61
Figura 20. Los ratones inyectados con DC lúpicas presentan una disminución de LB vírgenes y un aumento de IgM+ en los LB de bazo	62
Figura 21. Los ratones inyectados con DC lúpicas presentan un aumento en la población de linfocitos B CD5+ y Linfocitos B reguladores en el bazo.	64
Figura 22. Los ratones tratados con DC lúpicas presentan un aumento de los LB IL-10+ en el bazo	66
Figura 23. Los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan una disminución de LB vírgenes y un aumento	67

de IgM+ en los LB en el timo.

Figura 24. Los ratones prelámpicos tratados con DC de ratones 68

lámpicos presentan una aumento de LB CD5+ en el timo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	:	Anticuerpo Antinuclear
APC	:	Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell)
BWF1	:	Primera generación de crías de una cruce entre ratones NZB y NZW
cDC	:	Célula dendrítica convencional (Conventional Dendritic Cell)
DCs	:	Células Dendríticas (Dendritic Cells)
FCS	:	Suero fetal bovino (Fetal Calf Serum)
Igs	:	Inmunoglobulinas
IL	:	Interleuquina
IFN-α	:	Interferón alfa
IMF	:	Intensidad Media de Fluorescencia
LB	:	Linfocito B
LES	:	Lupus Eritematoso Sistémico
LT	:	Linfocito T
MHC	:	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NZB	:	New Zealand Black
NZW	:	New Zealand White
PBS	:	Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)
pDC	:	Célula dendrítica plasmacitoide (Plasmacytoid Dendritic Cell)
TLR	:	Receptor de tipo toll (Toll like receptor)

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida que se caracteriza por la activación de linfocitos T y B auto-reactivos, la producción de auto-anticuerpos y la deposición de complejos inmunes causando daño en diversos tejidos. Actualmente se reconoce al LES como un conjunto diverso de síntomas en la que factores de tipo ambiental, hormonal, epigenético e inmunoregulatorio actúan de manera conjunta causando la activación del sistema inmune de manera desregulada. Los linfocitos B juegan un rol crítico en el desarrollo de la patología del LES. Además de la producción de auto-anticuerpos, se ha descrito que los linfocitos B poseen la capacidad de producir citoquinas y de presentar antígenos, lo que junto a la expresión dual de receptor para el antígeno de los linfocitos B (BCR) y receptores de tipo toll (TLR), les permite participar tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptable. Esto sugiere que la interacción entre los LB y distintas poblaciones celulares afecta al desarrollo de la respuesta inmune. Específicamente se ha descrito que en modelos murinos de LES, la depleción de LB tiene un rol dual tanto protector como patogénico. En el presente estudio se propuso estudiar la funcionalidad de los LB durante el desarrollo del lupus, con especial atención en distintas subpoblaciones y al efecto generado por la activación mediante TLRs. Además se estudió *in vivo* el efecto de las células dendríticas (DC), células de gran relevancia en el desarrollo del LES, sobre los LB y su participación en el desarrollo de la enfermedad. En el modelo murino

de LES estudiado se encontraron claras alteraciones de los linfocitos B en el bazo en cuanto a su distribución poblacional y la producción de citoquinas. En el timo, se encontró un fuerte aumento de la población de linfocitos B en ratones lúpicos la que presenta alteraciones en su distribución poblacional y fenotipo, lo que se sugiere podría estar vinculado a una alteración en su función en la selección negativa de timocitos, proceso altamente relevante en el establecimiento de tolerancia central. Finalmente, el tratamiento con células dendríticas de bazo de ratones lúpicos genera cambios importantes en el fenotipo y la distribución poblacional en los linfocitos B de ratones prelúpicos, efecto que no se observa al tratar con células dendríticas provenientes de bazo de ratones controles.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease of unknown etiology characterized by the activation of autoreactive T and B cells, autoantibody production and immune complex deposition in various tissues causing damage. LES is currently recognized as a different set of symptoms in which environmental, hormonal, epigenetic and immunoregulatory factors acting together cause a dysregulated activation of the immune system. B cells play a critical role in the development of SLE. Besides the production of auto-antibodies, it has been described that B cells have the ability to produce cytokines and present antigens, which along with the dual expression of B cell receptor (BCR) and toll-like receptors (TLR) allows them to participate in both innate and adaptive immunity. This suggests that the interaction between the different cell populations and B cells affects the development of the immune response. Specifically as described in murine models of SLE, B cell depletion has shown that these population has a dual role both being pathogenic and protector. In the present work we aimed to study the functionality of B cells during the development of SLE, focusing on different subpopulations and the effect generated by activating TLRs. We also studied the effect of DC *in vivo*, a cell population of great importance in the development of SLE, over B cells and their participation in the development of the disease. In the mouse model of LES studied, spleen B cells alterations, either in their subpopulations distribution and cytokine production, were found. In the thymus, we found a strong increase in

the population of B lymphocytes in lupic mice which presented alterations in subpopulations distribution and phenotype, which suggests could be linked to an alteration in its role during negative selection of thymocytes, process highly relevant in establishing central tolerance. Finally, treatment with spleen dendritic cells from lupus mice generated significant changes in the phenotype and subpopulation distribution of B cells from prelupic mice, this effect was not observed when treating with spleen dendritic cells from control mice.

1. INTRODUCCION

1.1. LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad crónica de etiología desconocida muy difícil de diagnosticar debido a la alta variabilidad de síntomas que esta presenta. La visión actual del LES es que se trata de un grupo heterogéneo de síntomas, en la que los factores ambientales, hormonales, epigenéticos e inmunoregulatorios actúan de manera conjunta ya sea secuencialmente o simultáneamente sobre el sistema inmune. La acción de estos factores resulta en la generación de auto-anticuerpos, complejos inmunes, LT y LB auto-reactivos y citoquinas inflamatorias que inician y amplifican la inflamación y el daño a numerosos órganos blanco como el riñón, la piel, los pulmones, el cerebro y el corazón (Tsokos y col., 2011).

1.2. AUTOANTICUERPOS Y LUPUS

El LES es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la producción de un amplio espectro de anticuerpos producidos por la activación de los LB auto-reactivos que reconocen auto-antígenos principalmente de origen nuclear como nucleosomas, ssADN, dsADN o cuerpos apoptóticos. (Marks y col., 2012) La generación de estos auto-anticuerpos desemboca en la producción de un alto número de complejos inmunes los cuales se depositan en

diversos organos generando inflamación y daño tisular.

En particular, los Anticuerpos dirigidos contra componentes nucleares (ANAs) como nucleosomas (anti-ADN, anti histonas, anti-DNP o complejo DNA-histona), proteínas no histonas asociadas al ADN (anticentrómero, anti-Sc170, anti Ku, antiláminas nucleares, anti-HMG, anti-PCNA y otros), proteínas no histonas asociadas al ARN (anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La, anti-Jo-1 y otros) y dirigidos contra nucléolos son los principalmente encontrados en pacientes con autoinmunidad. Aunque un alto porcentaje de los pacientes diagnosticados con LES presentan ANA en el suero, estos no son específicos de esta patología pues pacientes diagnosticados con otras enfermedades autoinmunes también presentan ANAs en su sangre. La especificidad de los ANAs encontrados en el LES son principalmente dsADN, ssADN, Sm, Ro, la, cromatina e histonas. En general, los títulos de los auto-anticuerpos no se correlacionan con la enfermedad, excepto los anticuerpos anti-dsADN, sugiriendo un rol patogénico para ellos (Marks y col., 2012).

1.3. LINFOCITOS B Y LUPUS

Históricamente se ha asociado al LES con los LB debido a que en gran parte del daño tisular observado en esta patología se debe al depósito de complejos inmunes generados por la activación de LB auto-reactivos y por consiguiente al desarrollo de auto-anticuerpos que forman parte de estos complejos. De hecho, estudios en modelos murinos donde se ha eliminado la

población de LB utilizando herramientas genéticas en ratones con predisposición genética a desarrollar síntomas asociados al LES jamás presentaron vasculitis ni daño renal a diferencia de aquellos que poseían LB (Shlomchik y col., 1994). Sin embargo, estudios posteriores en modelos murinos demostraron que incluso en ratones con predisposición genética a desarrollar síntomas de LES, donde los LB son incapaces de generar anticuerpos, existe daño renal generado principalmente por la infiltración de LT en los tejidos (Chan y col, 1999). Esto sugiere que los LB no serían meros productores de auto-anticuerpos y que su aporte en el desarrollo de esta patología también podría estar vinculada a su rol como célula presentadora de antígeno (APC), específicamente donde LB auto-reactivos podrían activar LT auto-reactivos, o como productores de diversas citoquinas. (Ohl y col. 2011)(Lund, 2008)

Diversas alteraciones de los LB se observa tanto en pacientes como en modelos murinos de LES. A partir de estudios en modelos murinos se determinó que existe un aumento de los LB de la zona marginal (MZB) durante el desarrollo del LES. En humanos los MZB se encuentran en el bazo y en la circulación sanguínea sin embargo en ratones su localización está restringida al bazo (Steinger y col. 2006). Los MZB se encuentran en el seno de la zona marginal en el bazo por donde primero pasa la circulación sanguínea al ingresar, es por esto que los MZB son los primeros en capturar antígenos que se encuentran en la circulación sanguínea. Una vez activados los MZB migran hacia el folículo donde pueden presentar estos antígenos a LT CD4+

activándolos, los que a su vez activan LB foliculares o pueden recibir ayuda de LT foliculares diferenciándose hacia células plasmáticas por tanto induciendo la producción de anticuerpos (Sang y col., 2013). Los MZB presentan una baja afinidad por auto-antígenos, sin embargo como se encuentran aumentados en estados de autoinmunidad se sugiere podrían cooperar con el desarrollo de la patología, esto pues en modelos murinos de LES se ha visto se encuentran expandidos, más activados y con capacidad de generar anticuerpos anti-dsADN. (Wither y col. 2000)(Zeng y col., 2000)

Otra subpoblación que presenta alteraciones son los LB de memoria. En pacientes con LES activo se ha observado un incremento en la población de LB de memoria CD27+ en proporción a otras subpoblaciones. Interesantemente esta subpoblación pareciera ser más resistente a tratamientos de depleción de LB, probablemente debido a su baja proliferación (Jacobi y col., 2003) (Odendahl y col., 2000). En modelos murinos, el estudio de los LB de memoria es más complejo que en humanos debido a la carencia de marcadores que permitan su fácil identificación. Recientemente varias publicaciones han demostrado la existencia de otro subtipo de memoria de tipo IgM mientras la clásica usualmente había sido descrita del tipo IgG. (Pape y col., 2011)(Dogan y col., 2009). Así se describió que los LB de memoria de tipo IgG se originan en su mayoría a través de los centros germinales y dan origen a células plasmáticas de vida corta. En cambio los LB de memoria IgM pueden originarse tanto de manera dependiente como independiente del centro germinal. En cuanto a su función en el establecimiento de memoria inmunológica, los LB de

memoria IgM presentarían niveles de afinidad más bajos que aquellos LB de memoria IgG causando que sean estos últimos los que respondan en situaciones donde la concentración de antígenos es alta diferenciándose hacia células plasmáticas (PC). Una vez que esta concentración disminuye se sugiere serían los LB de memoria IgM los responsables de activarse y ya sea diferenciarse hacia célula productora de IgM o reingresar a los centros germinales realizando cambio de clase hacia IgG (Taylor y col., 2012). Aún existe controversia acerca de la existencia de este tipo de memoria en humanos, puesto que el sistema murino no es una fiel copia del humano, sin embargo existe evidencia que sugiere fuertemente la existencia de LB IgM de memoria en humanos (Reynaud y col., 2012). Aún queda por definir que rol cumplirían estas células en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes donde precisamente la concentración de auto-antígenos suele ser baja.

Una de las alteraciones más claras y que presentan relación directa con el desarrollo de la patología tanto en pacientes como modelos murinos de LES es el aumento en las células plasmáticas (Jacobi y col., 2003). En modelos murinos se ha observado la acumulación de PC tanto en los riñones (Starke y col., 2011) (Cassese y col., 2001) como en la médula ósea (Mumtaz y col., 2012).

En la actualidad varios estudios han demostrado que los LB poseerían roles efectoros o regulatorios, participando no solo en fenómenos de autoinmunidad sino también de tolerancia (Lund y col., 2010). En particular, recientemente varios estudios en modelos murinos han demostrado la

existencia de una sub-población de LB denominada LB reguladores debido a que poseen una alta capacidad supresora mediada principalmente por la producción de IL-10. Esta sub-población se encuentra en el bazo siendo aproximadamente un 2-3% y sus principales marcadores son la expresión de CD1d y CD5 (Yanaba y col., 2008). Numerosos estudios han demostrado la capacidad supresora de esta población *in vivo* en modelos de colitis, EAE, artritis y otras enfermedades (Yoshizaki y col., 2012) (Yang y col. 2012) (Horikawa y col., 2012) (Yanaba y col., 2011). En ratones con predisposición genética a presentar síntomas de LES esta población se encuentra expandida en el bazo presentado una alta producción de IL-10, lo que sugiere que fenómenos autoinmunes causan la expansión de esta población (Yanaba y col., 2009). En relación a esto último dos grupos de investigación publicaron el efecto de la depleción de LB, uno utilizando herramientas genéticas y otra mediante de la utilización de un anticuerpo, en ratones con predisposición genética a desarrollar síntomas de LES. Los resultados obtenidos demostraron que los LB tienen un rol tanto patogénico como protector en el desarrollo del LES en estos ratones, particularmente la depleción de la población de LB reguladores pareciera acelerar el desarrollo de los síntomas. (Watanabe y col., 2010)(Haas y col., 2009)

En humanos, se ha descrito que existe una población de LB con similares características supresoras a las descritas para la población de LB reguladores murinos. Esta población de LB expresa los marcadores CD19, CD24 y CD38, e inhiben la proliferación de LT así como la diferenciación de LT

virgenes hacia Th1 y Th17 probablemente mediante la producción de IL-10. (Flores-Borja y col., 2013). En pacientes con LES, se ha detectado que esta población produce menores niveles de IL-10 y carece de funciones supresoras (Blair y col., 2010)

Otra sub-población de LB que se ha visto presenta capacidad regulatoria son los LB B-1 provenientes de la cavidad peritoneal. Los LB B- 1 son los principales productores de anticuerpos naturales y participan en mantener la homeostasis de los tejidos, así como en la defensa frente a patógenos en las mucosas. Los LB B-1 se caracterizan por expresar un BCR altamente poli específico ya sea tanto a antígenos propios como a antígenos de origen microbiano (Baumgarth, 2011). Estudios recientes han demostrado la capacidad de esta sub-población de inhibir la producción de IFN- γ por parte de los LT CD4+, tanto *in vitro* como *in vivo* evitando el desarrollo de colitis mediante este mismo mecanismo (Margry y col., 2013) (Maseda y col., 2013).

En el modelo murino NZB/W se ha observado que la población de LB B-1 está presente en porcentajes mucho mayores en órganos como el bazo y otros linfonodos (Hayakawa y col. 1983)(Xu y col, 2004)(Mohan y col, 1998). Este aumento, según estudios realizados por el grupo de Matsushima sería ocasionado por una falla en la capacidad de homing de estas células en los ratones con predisposición genética a desarrollar LES, lo que causaría que los LB B-1 no permanecieran en la cavidad peritoneal como ocurre en ratones normales y migraran hacia otros órganos como el bazo, el timo, etc. (Ishikawa y Matsushima, 2007). Esta migración tendría un impacto relevante en el

establecimiento de tolerancia en estos ratones, pues ellos sugieren que los LB B-1 que migran al timo son capaces de interactuar con los LT que están siendo seleccionados permitiendo la activación de LT auto reactivos y su posterior salida a la periferia (Ishikawa y Matsushima, 2007). Además de participar en la selección de LT auto-reactivos, otro estudio demostró que los LB B-1 que salen de la cavidad peritoneal en su mayoría expresando IgM realizan cambio de clase y comienzan a expresar IgG (Enghard y col. 2010). En este sentido existen ciertas discrepancias con respecto al rol que tendrían los LB B-1 en el desarrollo del LES. Debido a su alta poli reactividad hacia antígenos propios se ha sugerido que si estas células realizaran cambio de clase hacia IgG podrían convertirse en una fuente de auto-anticuerpos. Sin embargo aunque existen estudios que mencionan este hecho como el del grupo de Enghard, otros donde se ha analizado la capacidad productora de auto-anticuerpos de LB CD5+ de pacientes con LES han descartado esta idea sugiriendo que solo los LB CD5- poseen la capacidad de producir auto-anticuerpos de alta afinidad IgG (Casali y col., 1989). Como ocurre con la sub-población de LB reguladores, suelen existir diferencias entre lo que se observa en ratones con lo que se encuentra descrito en humanos. Recientemente estudios en humanos han demostrado la existencia de LB B-1 en humanos que expresan otros marcadores distintos que en ratones. Esta población se encuentra expandida en pacientes con LES y presentaría mayores niveles de activación y capacidad de activar LT aloreactivos (Griffin y col., 2011).

1.4. LINFOCITOS B, LUPUS E INFECCIONES

El sistema inmune es el encargado de defender al organismo de diversos patógenos mientras al mismo tiempo se encarga de mantener la tolerancia frente a aquello inocuo. Durante el funcionamiento de este sistema tan complejo a veces ocurren situaciones en los que este fino equilibrio se rompe y como consecuencia ocurren fenómenos de autoinmunidad o inmunodeficiencia. Dentro de estas situaciones el impacto de las infecciones en el desarrollo de la autoinmunidad pareciera tener un rol importante. En enfermedades tan complejas como el LES, se ha sugerido que la amplia diversidad de síntomas estaría vinculado a la presencia de distintos agentes infecciosos. Es así como altos títulos de anticuerpos IgM contra rubella han sido asociados con psicosis o depresión mientras que altos títulos de anticuerpos contra el virus Epstein-Barr han sido correlacionados con erupciones dérmicas y dolor articular pero no con alteraciones renales o psíquicas (Zandman-Goddard y col., 2008) (Zandman-Goddard y col., 2009). Además en modelos murinos de LES se ha logrado demostrar que tanto la inyección de LPS, un componente bacteriano, así como otras infecciones son capaces de acelerar o gatillar el desarrollo de la enfermedad (Deng y col., 2008) (Ka y col., 2007). A pesar de que existe evidencia que apoya el rol negativo de las infecciones en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, en 1989 Strachan acuñó el concepto de la "Teoría de la higiene", en la que propone que el aumento de las enfermedades autoinmunes en el mundo occidental ocurrido durante las últimas décadas se

debe en parte a una baja en las enfermedades infecciosas y la mejoría en las condiciones de higiene (Stratchan, 1989). Lamentablemente la mayoría de la evidencia al respecto se basa en estudios epidemiológicos retrospectivos o en estudios experimentales con modelos animales. Un ejemplo que apoya esta teoría fue demostrado en la infección con helmintos *Schistosoma mansoni* o con virus de coxsackie la cual previene el desarrollo de diabetes en ratones con predisposición genética (Tracy y col, 2002) (Zaccone y col., 2003).

A diferencia de otras células del sistema inmune los LB expresan tanto un receptor antígeno específico (BCR) y receptores de tipo Toll (TLR). La activación dual de estos receptores permite regular las respuestas realizadas por los LB creando directamente un vínculo entre respuestas inmune innatas y respuestas inmunes adaptables (Rawlings y col. 2012). Los TLRs son un subtipo de receptores comúnmente denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, debido a su sigla en inglés), los que usualmente están expresados en las células que participan en a la inmunidad innata. Su rol es detectar la presencia de infección mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, debido a su sigla en inglés) que están presentes en organismos microbianos pero ausentes en las células eucariotas (Janeway, 2001). Los TLRs son glicoproteínas de transmembrana de tipo I que consisten de un dominio extracelular con motivos ricos en repetidos de leucina (LRR) y un dominio Toll/Interleuquina-1R que contribuye a la señalización citoplasmática (Booth y col., 2011). Al menos 13 tipos de TLR han

sido descritos en células de mamíferos, con distintas localizaciones sub-celulares como se muestra en la Figura 1.

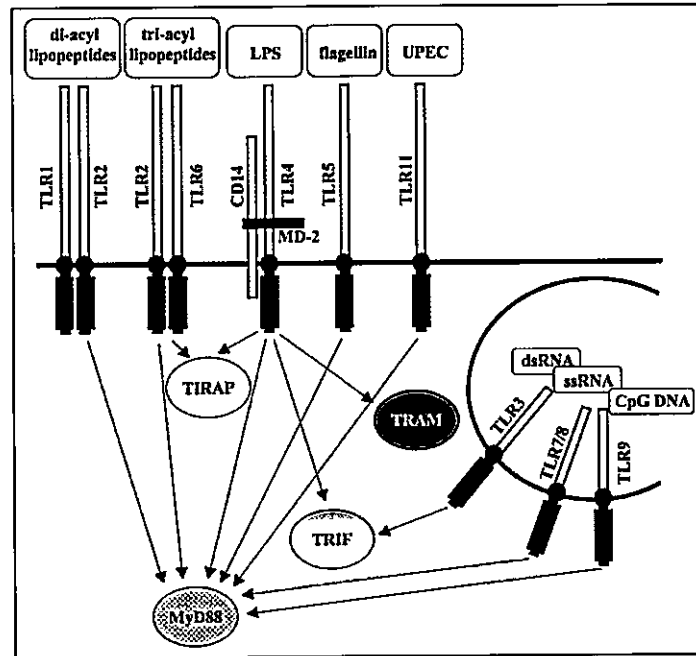


Figura 1. Localización sub-celular y especificidad de los distintos TLRs (Anders y col., 2005)

Además de reconocer material genético de origen viral o bacteriano, los TLRs endosomales TLR3, TLR7/8 y TLR9 son también capaces de detectar ácidos nucleicos propios. La conexión entre estos receptores y el LES se origina principalmente a través de resultados obtenidos en modelos murinos donde se ha reportado que TLR9 y TLR7 en los LB tendrían roles relevantes en la protección y desarrollo de la patología (Desnues y col. 2014) (Teichmann y col., 2013) (Koh y col., 2013) (Hwang y col., 2012) (Lenert y col., 2005) (Ehlers y col., 2006).

1.5. LINFOCITOS B TÍMICOS

Como ya se mencionó, los LB poseen varios mecanismos para mantener la tolerancia a nivel periférico. Sin embargo existe otro mecanismo fundamental para lograr el establecimiento de la tolerancia y ese ocurre en el timo. En primer lugar en la corteza del timo ocurre la selección positiva de timocitos gracias a las células epiteliales tímicas ricas en la expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) las cuales permiten la selección de aquellos clones que reconocen estas moléculas mediante su TCR. En segundo lugar los timocitos seleccionados migran hacia la médula del timo donde ocurre la selección negativa en la que participan diversos tipos de APC. Estas células presentan péptidos propios en las moléculas MHC a los linfocitos T los cuales son reconocidos con distintas afinidades. Los LT que reconocen antígenos con alta afinidad son eliminados (Klein y col., 2009). Varios tipos de APC poseen la capacidad de presentar antígenos a los timocitos y causar la deleción de clones CD4+, entre ellas las DCs residentes y migratorias, los macrófagos y los LB (Guerri y col., 2013). En el timo existe una pequeña población de LB cuyo origen no es claro pudiendo tratarse de LB que migran desde la periferia o LB que se desarrollan en el timo a partir de progenitores (Akashi y col., 2000) (Mori y col., 1997) (Ceredig, 2002).

Los LB en el timo se ubican en la zona limítrofe entre el córtex y la médula, lugar donde ocurre principalmente la selección negativa por lo que se ha propuesto que las APC presentes en este territorio estarían involucradas en

este proceso (Akirav y col., 2011) (Frommer y col., 2010) (Ferrero y col., 1999). Un estudio reciente sugiere que los LB tendrían la capacidad de capturar una amplia diversidad de auto-antígenos mediante su BCR, procesarlos y presentarlos posteriormente a los timocitos realizando la selección negativa de estos (Perera y col., 2013). Otros resultados sugieren que los LB estarían asociados a la generación de linfocitos T reguladores tímicos o inducidos en la periferia (Morlachi y col., 2011) (Walters y col., 2014).

En condiciones normales se sabe que los LB están presentes en muy baja proporción en el timo lo que aumenta levemente con la edad, con porcentajes en ratones que no superan el 1-2% (Miyama-Inaba y col., 1988). Sin embargo en condiciones favorables al desarrollo de una enfermedad autoinmune este porcentaje aumenta considerablemente (Fariñas y col. 1990) (Dumont y col. 1983). Como ya se mencionó, en el caso del modelo murino de lupus BWF1, existe una migración alterada de LB B-1 hacia otros órganos abandonando la cavidad peritoneal. Los LB B-1 llegan al timo donde se sugiere podrían activar LT auto reactivos cooperando con el desarrollo de la patología autoinmune (Ishikawa y Matsushima, 2007). En modelos murinos de miastenia gravis, una enfermedad neuromuscular autoinmune caracterizada por el desarrollo de auto-anticuerpos contra el receptor de acetil-colina, sugieren que el IFN- β y SDF-1 participan en el reclutamiento de LB hacia el timo (Cufi y col., 2013) (Weiss y col., 2013). En relación a la migración de LB hacia el timo, se ha observado que los fenómenos inflamatorios mediarían esta migración hacia el timo (Hodge y col., 2012).



1.6. LINFOCITOS B Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DC) son una población heterogénea de células que juegan un rol trascendental en la iniciación y regulación tanto de las respuestas inmunes innatas como adaptable (Steinman y col., 2010). Las células dendríticas convencionales (cDC) y plasmocitoides (pDC) representan las dos principales subpoblaciones de DC. Por una parte, las cDC se caracterizan por expresar elevados niveles de la integrina CD11c y presentar una alta capacidad de estimular fuertemente la respuesta inmune adaptable. Por otra parte, las pDC se caracterizan por expresar menores niveles de CD11c, expresar además B220 (CD45R), CD317(PDCA-1) y secretar elevados niveles de la citoquina IFN- α cuando reconocen secuencias de DNA de virus o bacterias (Reizis et al, 2011).

Se ha descrito a las DC como vigilantes de la periferia donde continuamente capturan antígenos lo que son procesados y presentados en su superficie en el contexto de moléculas de MHC II. Señales de inflamación o infección causan la maduración y migración de las DC hacia los linfonodos donde presentan antígenos a los linfocitos T causando la diferenciación y activación a distintos tipos de LT helper o LT regulador (Banchereau y col., 2000). Sin embargo las DC no solo interactúan con LT sino que también con LB ayudando por ejemplo a la diferenciación hacia células plasmáticas (Jego y col., 2003) (Poeck y col., 2004) (Jorgensen y col., 2010), al cambio de isotipo hacia IgA (Fayette y col., 1997), a proliferar y secretar IgG (Shaw y col., 2010),

a inducir la producción de IL-10 por parte de los LB (Parcina y col., 2013) y a la transferencia de antígenos no procesados iniciando una respuesta humoral (Wykes y col., 1998). En los últimos años, se han descrito roles adicionales para los LB además de la producción de anticuerpos. Se ha descrito que la interacción entre LB-DC no solo tiene un efecto sobre los LB, sino también sobre las DC afectando su función y maduración (Morva y col., 2012), regulando la producción de IL-12 por parte de las DC (Moulin y col., 2000) y la producción de IFN- α por parte de pDC (Berggren y col., 2012). Recientes publicaciones han establecido un vínculo entre los LB, las pDC y los neutrófilos en patologías como la diabetes y el LES sugiriendo que el efecto combinado de estas tres poblaciones sería de gran importancia en el desarrollo de estas enfermedades autoinmunes (Diana y col., 2013) (Lande y col., 2011).

1.7. MODELO MURINO BWF1

Los modelos murinos para la enfermedad LES son una herramienta fundamental y los más estudiados son la cepa MRL/lpr, la cepa BXSB/Yaa y la primera generación proveniente del cruzamiento entre las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW) que se denomina BWF1 los que desarrollan espontáneamente síntomas asociados al LES. Además es posible inducir lupus en una cepa endogámica luego de la estimulación con el alcano terpenoide pristano. Todos estos modelos presentan distintos síntomas de la

enfermedad producida en humanos, como producción de auto-anticuerpos, activación linfocítica, hiperplasia y nefritis.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el modelo BWF1, donde las cepas parentales NZW y NZB muestran pocas características de autoinmunidad, mientras que las hembras BWF1 desarrollan varios de los síntomas presentes en el LES. Las hembras BWF1 desarrollan espontáneamente, en un periodo relativo entre 6 a 10 meses de edad, una enfermedad autoinmune caracterizada por la alta producción de anticuerpos antinucleares (ANAs) en el suero (incluyendo anti-dsADN IgG cuya mayoría es IgG2a e IgG3) y por el desarrollo de una glomerulonefritis fatal mediada por complejos inmunes que deriva finalmente en una falla renal y muerte a los 10-12 meses de edad (Perry y col., 2011). Se considera que la cepa BWF1 es el modelo que mejor replica los síntomas observados durante la enfermedad del lupus en humanos. Sin embargo, a diferencia de los pacientes con LES y los modelos MRL/lpr y BXSB/Yaa, los ratones BWF1 carecen de auto-anticuerpos contra ARN (Perry y col., 2011).

2. HIPOTESIS

Los linfocitos B poseen alteraciones que afectan la interacción con otras subpoblaciones celulares incidiendo en el desarrollo del lupus eritematoso sistémico.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar distintas subpoblaciones de linfocitos B en el modelo murino de lupus BWF1 y analizar su rol en distintos aspectos del desarrollo de la enfermedad.

3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar la población de linfocitos B tanto de ratones lúpicos, prelúpicos y controles. Estudiar las poblaciones de linfocitos B de memoria y reguladoras.
- Evaluar *in vitro* el efecto de distintos ligandos TLR en las distintas poblaciones de LB, mediante la producción de citoquinas y expresión de moléculas de activación.
- Analizar el efecto de la interacción entre células dendríticas y linfocitos B *in vivo*. Estudiar el efecto de introducir células dendríticas provenientes de ratones lúpicos sobre linfocitos B de ratones prelúpicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Animales**

Ratones hembras BWF1 y NZW/lacJ se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Para los experimentos se utilizaron ratones BWF1 de 3-4 meses de edad denominados prelúpicos para los efectos de esta tesis debido a que no poseen ningún síntoma de la enfermedad y ratones BWF1 de entre 7-10 meses de edad que se denominaron lúpicos, los cuales producen anticuerpos anti-dsADN y presentan daño renal con altos niveles de proteínas en la orina (proteinuria de 500mg/dL). Como ratones controles se utilizaron hembras de la cruce de las cepas de ratones NZW x Balb/c y hembras Balb/c de las mismas edades de los ratones tanto prelúpicos (controles jóvenes) como lúpicos (controles viejos). Todos los ratones se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad, con aire filtrado y comida autoclavada, en el bioterio de la Fundación Ciencia para la vida (Santiago, Chile). Los animales se sacrificaron mediante la exposición a dióxido de carbono.

- **ELISA para la detección de anticuerpos anti-DNA de doble hebra.**

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene Nunc International, USA) recubiertas con 61ng de DNA de timo de cabra (SIGMA, USA) por pozo disuelto en buffer SSC (NaCl 0,15M, citrato de sodio 0,015M pH=8). Se incubaron por 18 horas a 37°C y se lavaron tres veces con PBS-

Tween 0,05%. Luego, las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-Tween 0,05% y se lavaron tres veces con una solución de PBS-Tween 0,05%. Posteriormente se agregaron los sueros de los ratones 1/250 en PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP (DAKO, USA) diluido 1/2000 en PBS-Tween 0,05%. Por último, las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100µl por pozo del sustrato proveniente del kit TMB Substrate Reagent Set (BD Bioscience, USA). La reacción se detuvo usando 50µl de una solución 1M de H₃PO₄ (Merk,USA) y se leyeron las densidades ópticas en un espectrofotómetro (JENWAY, UK).

- **Anticuerpos y reactivos**

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales adquiridos en BD Biosciences: IAd FITC clon AMS-32.1, IAd purificado clon 34-5-3, IgD FITC clon 11-26c.2a, CD79b FITC clon HM79b. Anticuerpos adquiridos en eBiosciences: CD11c PE clon N418, CD19 APC-eFluor 780 clon 1D3, CD274 PE clon MIH5, CD273 PE clon TY25, Siglec G APC clon SH2.1, GL7 eFluor 660 clon GL7, CD5 PECY7 clon 53-7.3, CD40 APC clon 1C10, Foxp3 PECy7 clon FJK-16s, CD25 APC clon PC61.5. Anticuerpos adquiridos en Biolegend: IL10 PE clon JES-516E3, CD11c FITC clon N418, IgM PECY7 clon

RMM-1, CD138 PE clon 281-2, CD45R/B220 APC clon RA3-6B2, CD1d Alexa Fluor 647 clon 1B1, CD19 FITC clon 6D5, CD4 PE clon RM4-5. Para determinar viabilidad se utilizó Fixable Viability Dye eFluor® 780 (ebioscience) o PI (Sigma Aldrich, USA). Para la activación de linfocitos T se utilizó el anticuerpo purificado CD3 clon 145-2C11 adquirido en eBiosciences. Para el ensayo de migración se utilizó Cell Trace Violet cell proliferation kit (Molecular Probes).

- **Inmunofluorescencia**

Las células de bazo y timo, se incubaron por 15 minutos con anti-CD16/CD32 dilución 1/400 (clon 2.4G2, BD Biosciences) para bloquear el receptor Fc. Completado este tiempo las células se lavaron con PBS-FCS 2% y se centrifugaron a 600 x g por 7 min. Posteriormente, las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en PBS-FCS 2% durante 20 minutos a 4°C. Enseguida las células se lavaron con PBS+FCS 2%, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet de células se resuspendió en aproximadamente 300 µl de PBS+FCS 2% para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience, USA). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva (BD Biosciences) y FlowJo (TreeStar).

- **Detección intracelular de Foxp3 y de IL-10**

Para el marcaje intracelular del factor transcripcional FoxP3, luego del marcaje de superficie antes descrito, las células se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en 300 μ l de la solución de fijación/permeabilización (eBioscience) y se incubó durante 30 minutos. Luego las células se lavaron con 700 μ l de buffer de permeabilización y se centrifugaron a 700 g por 8 minutos a 4°C. Se agregó a cada tubo 50 μ l del anticuerpo correspondiente; anti-Foxp3 (eBioscience), o el control de isotipo (rat IgG2a k, eBioscience) diluidos en buffer de permeabilización y se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4°C. Posteriormente se lavaron las células con 700 μ l del buffer de permeabilización y se centrifugaron a 700 g por 7 minutos a 4°C. Finalmente se resuspendieron en PBS+FCS 2% para luego ser analizadas mediante citometría de flujo.

Para el marcaje intracelular de IL-10 primero se activaron esplenocitos totales en RPMI+10%FCS (1×10^6 células/ ml) agregando LPS (10 mg/ml, Sigma), PMA (50 ng/ml; Sigma), ionomicina (500 ng/ml; Sigma) y Golgi Stop (BD Biosciences) durante 5 horas a 37°C. Se recuperaron las células pasado este tiempo, se centrifugaron y luego del marcaje de superficie antes descrito, las células se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en 300 μ l de la solución de cytofix/cytoperm (BD Bioscience) y se incubó durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Luego las células se lavaron con una solución 1x de buffer Perm/Wash (BD Biosciences) y se centrifugaron a 700 g por 8 minutos a

4°C. Se agregó a cada tubo 50 uL de una solución del anticuerpo IL-10 PE en buffer Perm/Wash y se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4°C. Posteriormente se lavaron las células con 700 µl del buffer Perm/Wash y se centrifugaron a 700 g por 8 minutos. Finalmente se resuspendieron en PBS+FCS 2% para luego ser analizadas mediante citometría de flujo.

- **Aislamiento de células de bazo y timo**

Las células se obtuvieron a partir de bazo y timo de ratones control, prelúpicos y lúpicos. Los órganos se disgregaron mecánicamente y los tejidos se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm para eliminar los agregados celulares. En el caso del bazo, para lisar los glóbulos rojos, las células se resuspendieron en 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Completado este tiempo, las células se lavaron una vez con 10 ml de RPMI + 10% FCS y se centrifugaron a 600 g por 7 minutos a 4°C. Las distintas poblaciones celulares se determinaron mediante inmunofluorescencia y análisis mediante citometría de flujo. Las células obtenidas de cada órgano se contaron usando una cámara de Neubauer para obtener el número total de células promedio recolectadas de cada órgano para cada uno de los ratones.

- **Purificación de LB de bazo**

El bazo de los diferentes ratones se disgregó mecánicamente y se pasó a través de una malla metálica de 90 μm para eliminar los agregados celulares. Para lisar los glóbulos rojos, las células se resuspendieron en 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH_4Cl 0,15M, KHCO_3 10mM y Na_2EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de RPMI + 10%FCS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Luego se resuspendieron a una concentración de 20×10^6 de células en 40 μL de buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FCS 0,5%) y se incubaron con 10 μl de la mezcla de anticuerpos del kit de aislamiento de linfocitos B (*B cell isolation kit* de Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4°C con agitación. Transcurrido este tiempo se agregaron 30 μL de buffer de purificación por cada 20×10^6 células y 20 μL de las perlas cubiertas con biotina del mismo kit (*B cell isolation kit*, Miltenyi biotec). Las células se incubaron 15 minutos más en oscuridad, agitación y a 4°C. Las células se seleccionaron negativamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec).

- **Purificación de DCs de bazo**

El bazo de los diferentes ratones se disgregó mecánicamente y se resuspendió en 4,5 ml de RPMI-FCS 10%. Las células se digirieron en

presencia de 1mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20 µg/ml de DNasa (Sigma, USA), y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente, las células se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm y las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Para lisar los glóbulos rojos, las células se resuspendieron en 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FCS 5%), se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 300 µl de buffer de purificación por cada 1x10⁸ de células y se incubaron con 30 µl de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) durante 20 minutos a 4°C con agitación. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer de purificación, se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 1 ml de buffer de purificación. Las células se seleccionaron positivamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec).

- **Aislamiento de diferentes sub-poblaciones celulares mediante cell sorter**

Se realizó la digestión de los bazos o timos de acuerdo al protocolo previamente descrito. Las células totales del bazo o de timo se marcaron durante 20 minutos a 4°C en PBS+2% FCS con diferentes combinaciones de

anticuerpos dependiendo de la población a seleccionar. Para obtener DC de bazo las células totales fueron depletadas previamente de LT y LB. Para depletar de LB se incubó el extracto de células totales con el anticuerpo anti-CD79b FITC (clon HM79b) durante 15 min a 4°C en agitación. Las células fueron lavadas y posteriormente incubadas durante 15 min a 4°C, en oscuridad y agitación con el anticuerpo secundario anti-Armenian Hamster IgG2/3 FITC. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de 20×10^6 cel/mL con medio PBS+2mM EDTA+0,1%BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads Goat anti-Mouse IgG durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación las células fueron pasadas por magneto y la fracción negativa fue recuperada. Posteriormente la fracción negativa fue depletada de LT. Para esto se incubó las células con el anticuerpo anti-CD3 (clon 17A2) durante 15 min a 4°C en agitación y oscuridad. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de 20×10^6 cel/mL con medio PBS+2mM EDTA+0,1%BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads Sheep anti-Rat IgG durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación las células fueron pasadas por magneto y la fracción negativa fue recuperada, la cual fue posteriormente marcada con los anticuerpos CD79b FITC, CD11c PE y B220 PeCy7, para lograr separar mediante cell sorter las células dendríticas. En el caso de la purificación de LB, se marcaron los bazos con CD11c, B220 y CD19 recuperando la población CD11c-CD19+B220+. Para la purificación de APCs provenientes de timo las muestras se marcaron con CD3 FITC, CD11 PE y

CD19 APCeFluor780 recuperando las poblaciones CD11c+ (DC) y CD19+ (LB) por separado. Las poblaciones celulares se separaron utilizando un cell sorter FACS Aria II (BD Biosciences) perteneciente a la Fundación Ciencia & Vida.

- **Activación LB mediante ligandos de TLR**

Para realizar esta activación se purificaron LB de ratones lúpicos o controles mediante separación inmunomagnética utilizando el protocolo previamente descrito. Los LB purificados se resuspendieron a 1×10^6 células por ml en RPMI+10%FCS+ β -Mercaptoetanol (0,05 μ M). Se utilizó LPS (*E.coli*) 2ug/ml para activar LB mediante TLR4, CpG-B 2ug/ml para activar LB mediante TLR9, poly I:C 20ug/ml para activar a través de TLR3 y R848 0,25ug/ml para activar LB a través de TLR7 todos adquiridos de la empresa Invivogen excepto LPS que fue adquirido en Sigma. Las células se activaron durante 24 o 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Cumplido este tiempo las células se marcaron con distintos anticuerpos de superficie y se analizaron mediante citometría de flujo. Además se obtuvieron los sobrenadantes de la activación y se analizó la presencia de citoquinas mediante citometría de flujo utilizando el BD CBA *Inflammation kit* (BD Biosciences)

- **Cocultivos de Timocitos y APCs de Timo**

Para realizar estos cocultivos se extrajeron timos o bazos de ratones lúpicos los que se disgregaron mecánicamente y se incubaron en presencia de

1mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20 µg/ml de DNasa (Sigma, USA), durante 1hr a 37°C con agitación continua. Posteriormente, las células se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm y las células se centrifugaron a 600 g por 7 minutos a 4°C. Luego de realizar los marcajes necesarios las muestras fueron purificadas mediante cell sorter para obtener las poblaciones de LB de timo o bazo. Para la purificación de timocitos, se extrajo timo de ratones controles NZW/Balb/c de 7 meses. Estos se disgregaron mecánicamente y se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm, luego las células se centrifugaron a 600 g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente se incubaron las células a 100×10^6 cel/ml por 10 minutos en RPMI suplementado con FCS al 10% y se agregó anti-CD16/CD32 dilución 1/400 (clon 2.4G2, BD Biosciences). Una vez transcurrido este tiempo se agregó anti-IAd (dilución 1/100) y se incubaron durante 20 minutos más. Luego las células se lavaron con RPMI + 10% FCS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Posteriormente se resuspendieron las células en buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FCS 0,5%) a 125×10^6 cel/ml y se agregó goat anti-mouse IgG microbeads MACS (Miltenyi Biotec) (20ul por cada 100×10^6 cel). Se incubaron las células 20 minutos a 4°C en agitación continua. Finalmente las células se lavaron con buffer de purificación, se centrifugaron a 600 g por 7 minutos a 4°C y las células se seleccionaron negativamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec). Los LB de timo o de bazo obtenidos mediante purificación con Cell Sorter fueron esterilizados utilizando medio con RPMI+10%FCS suplementado con

antibióticos (300 U/ml penicilina + 0,3mg/ml estreptomicina). Finalmente se realizaron co-cultivos utilizando placas de 96 pocillos de fondo redondo y medio IMDM suplementado con 10% FCS, 0,5µg/mL Fungizona y 0,05 µM B-mercaptoetanol. Se colocaron 20,000 LB de timo o bazo más 100,000 timocitos depletados de APC por pozo en presencia de 1ug/ml de anticuerpo purificado anti-CD3 clon 145-2C11 (eBiosciences). El cocultivo se mantuvo durante 5 días a 37°C y 5% CO₂. Posterior a esto las células se analizaron mediante citometría de flujo.

- **Transferencia adoptiva de DC de ratones lúpicos y de ratones control NZW/Balb/c en ratones prelúpicos**

Para realizar este experimento se purificaron DC ya sea de ratones lúpicos o ratones controles NZW/Balb/c mediante cell sorter como ya fue previamente descrito. Se inyectaron 4×10^6 DC por ratón. Como receptores se utilizaron ratones prelúpicos de 2 meses de edad que no presentaban síntomas de enfermedad. Se realizaron dos inyecciones i.v. de DC por ratón, una al día que denominamos 0 y la segunda al día 30 post primera inyección. Se realizó un seguimiento de cada uno de los ratones, 4 por grupo, donde se midió proteinuria y auto-anticuerpos en sangre cada 15 días. Finalmente en el día 60 post primera inyección se sacrificaron los ratones de cada grupo y se analizó por citometría de flujo, bazo, timo y sangre (Figura 3.).

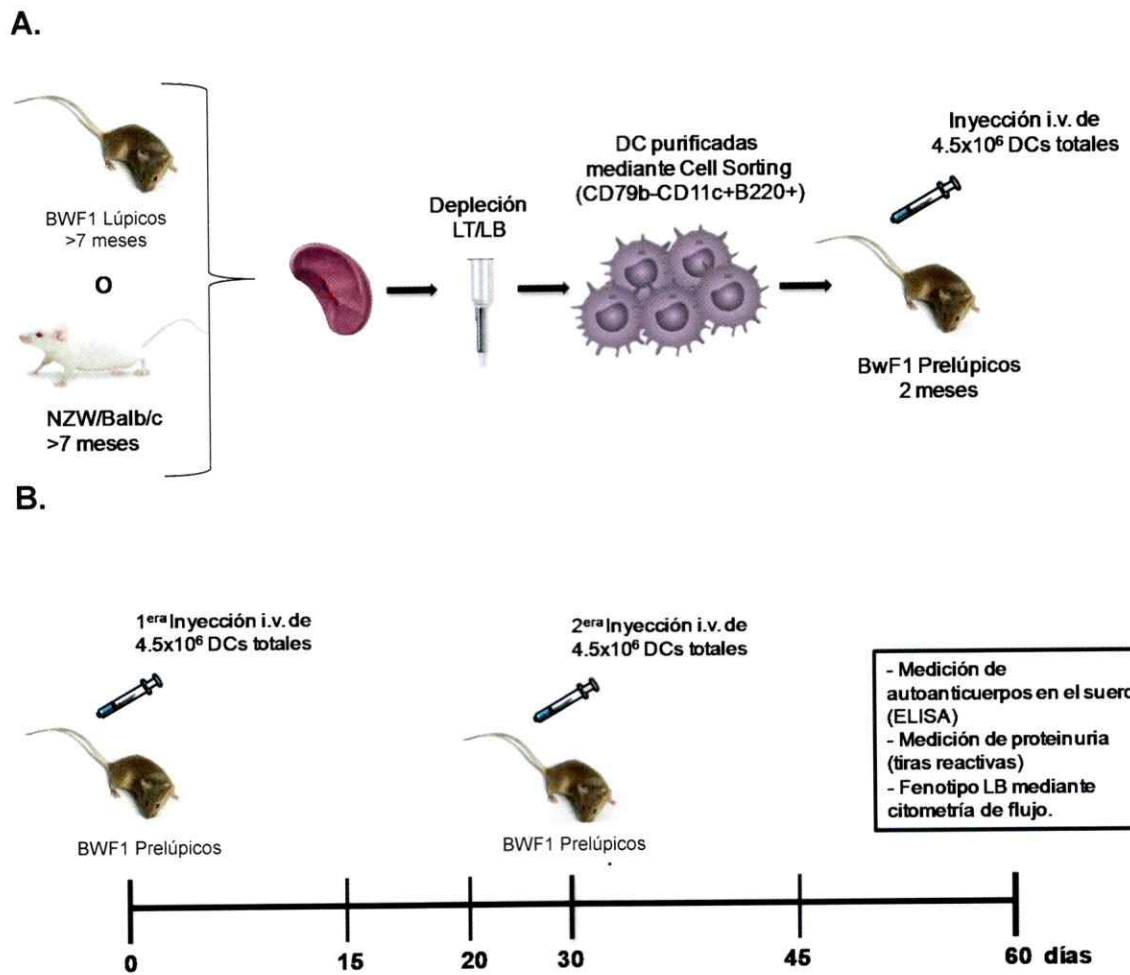


Figura 2. Metodología del experimento de transferencia adoptiva de DC de ratón lúpico o control en un ratón prelúpico. A. Diagrama representativo de la metodología utilizada previamente detallada en materiales y métodos. **B.** Cronología del experimento.

- **Análisis estadístico**

La comparación de los datos obtenidos de los diferentes ratones se realizó utilizando el ensayo Mann-Whitney no paramétrico cuando se evaluaron dos grupos de ratones y utilizando el ensayo Kruskal-Wallis no paramétrico con dos colas en caso de comparar cuatro grupos, ambos ensayos con intervalos de confianza de 95%. Todos los test estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.

5. RESULTADOS

5.1. Alteraciones en la población de Linfocitos B de bazo durante el desarrollo del lupus.

En los últimos años numerosas publicaciones han descrito a los linfocitos B como células cuya función va más allá de la producción de anticuerpos. Se ha demostrado su importante rol como productores de citoquinas, como células presentadoras de antígeno, ellas poseen la capacidad de vincular la inmunidad innata y adaptativa. Los LB juegan un papel fundamental en el desarrollo del lupus y en este trabajo investigamos estas propiedades de los LB durante el desarrollo de la enfermedad.

A lo largo de este trabajo analizamos la presencia de distintas subpoblaciones de LB durante el desarrollo del LES, para lo cual comparamos ratones controles Balb/c de la misma edad de los ratones prelúpicos y lúpicos.

Resultados previos de nuestro laboratorio (Gleisner y col., 2013) demostraron que en el bazo de los ratones lúpicos se acumulan células dendríticas (DC) tanto plasmocitoides (pDC) como convencionales (cDC). Por lo tanto nos preguntamos si esto podría afectar a los LB presentes en este órgano.

Los ratones lúpicos presentan cierto grado de esplenomegalia como se muestra en la Figura 3.A, con diferencias significativas en el número absoluto de esplenocitos entre ratones lúpicos y prelúpicos.

Cuando analizamos LB, definidos como CD19+CD11-, observamos que los ratones prelúpicos poseen un porcentaje significativamente menor de LB comparado a ratones lúpicos. Cuando estos porcentajes se traducen en valores absolutos la diferencia entre ratones prelúpicos y lúpicos se acrecenta, lo cual en parte se debe a la esplenomegalia presente en los ratones lúpicos (Figura 3.B y C.).

La capacidad para participar como célula presentadora de antígeno de los LB fue analizada por la expresión de moléculas MHC y moléculas de co-estimulación mediante citometría de flujo (ver Anexos). Nuestros resultados muestran que los LB de los ratones lúpicos expresan CD86, PD-L1 y PD-L2 en niveles similares a LB de ratones controles de la misma edad (ver Anexos). Por otra parte, se ha demostrado que Siglec-G posee la capacidad de inhibir la señal generada a través del BCR en los linfocitos B (Jellusova y col., 2011). Al comparar la expresión de Siglec-G en los LB de ratones lúpicos y ratones controles viejos determinamos que existe una disminución en la intensidad media para Siglec-G (ver Anexos). Estos resultados sugieren que los LB de los ratones lúpicos podrían ser hiperreactivos debido a la falta de señales inhibitorias del BCR.

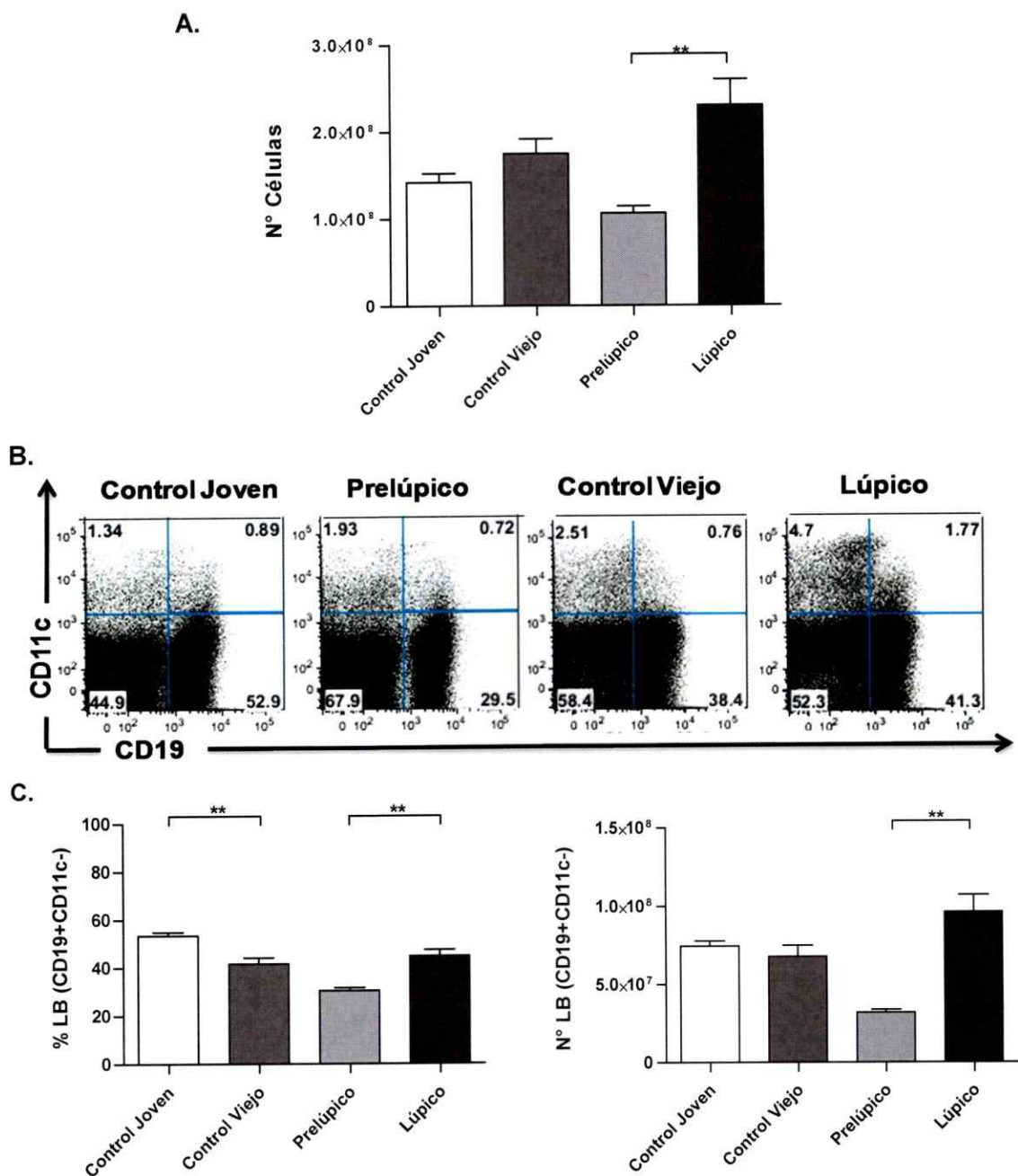
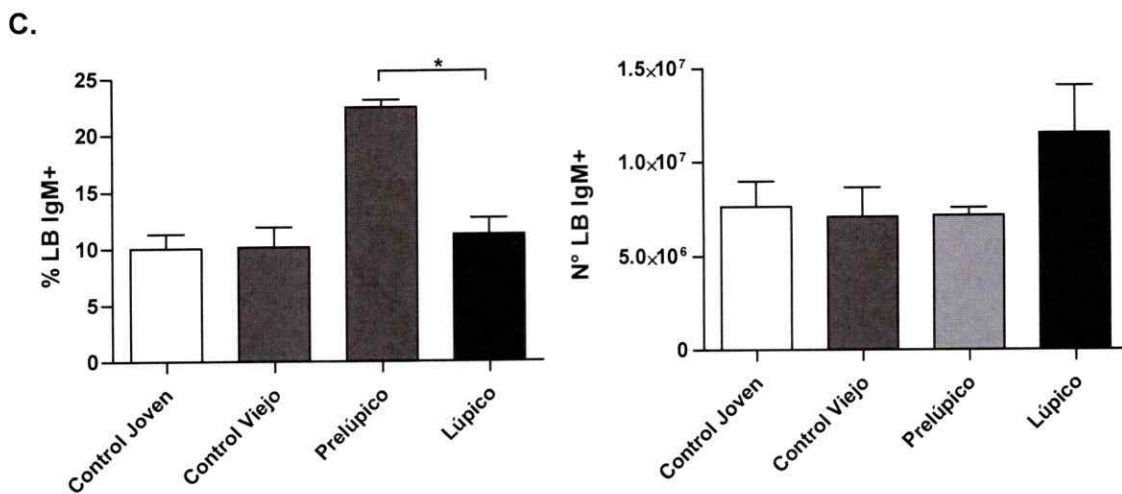
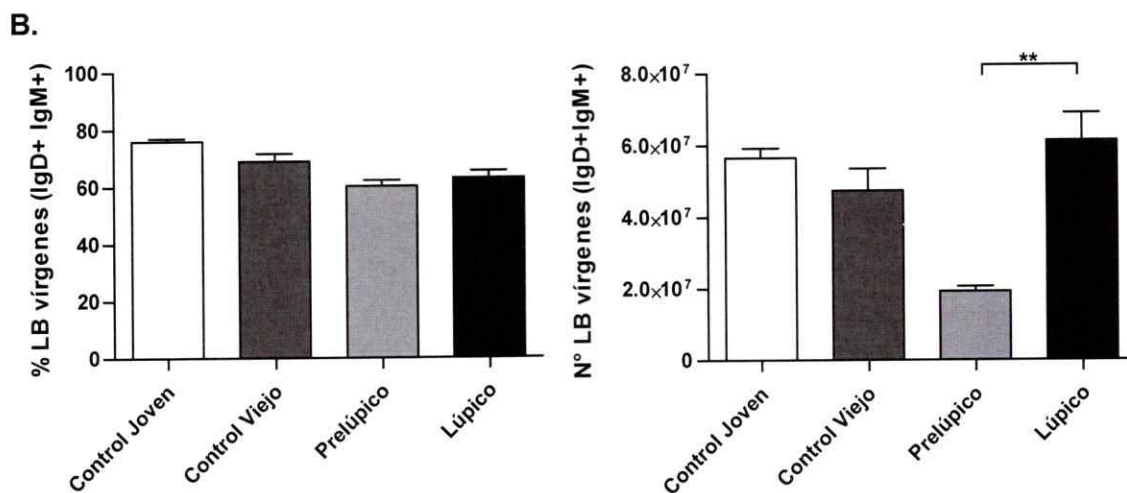
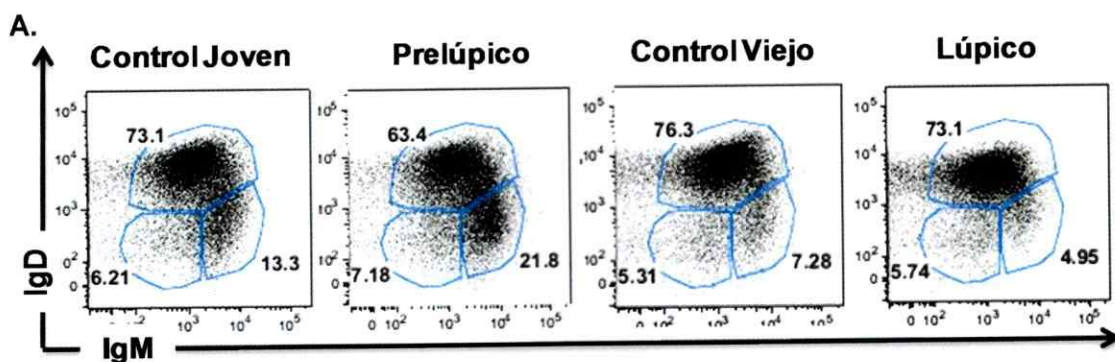


Figura 3. Ratones lúpicos presentan esplenomegalia y un aumento en LB en el bazo en comparación a ratones prelúpticos. A. Cuantificación del número total de células obtenidas por bazo de ratones control Balb/c joven (n=4), prelúpticos (n=6), control Balb/c viejo (n=9) y lúpicos (n=13). **B.** Análisis de citometría de flujo de la población de LB en los distintos grupos estudiados. **C.** Cuantificación de los resultados mostrados en **B.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

En un estudio reciente se demostró que en sangre periférica de pacientes con lupus se observa una expansión de LB de transición inmaduros, LB de memoria y células plasmáticas en detrimento de LB vírgenes (Dorner et al 2011). En base a estos resultados analizamos los LB vírgenes, LB de memoria de corto (IgM+IgD-) y largo plazo (IgM-IgD-) en ratones controles jóvenes, prelúpicos, controles viejos y lúpicos (Figura 4). Sólo se observó un incremento importante de LB IgM+ en el bazo de los ratones prelúpicos en comparación a los ratones lúpicos (Figura 4.B). Esto podría indicar que está sub-población de LB de memoria IgM+ de largo plazo realiza cambio de clase ya sea a IgG hacia un linfocito B de memoria clásico o migra del bazo hacia otros órganos durante el transcurso de la enfermedad. Además se observó una tendencia a un incremento en el porcentaje de linfocitos B IgD-IgM- de memoria clásico en el bazo de los ratones lúpicos diferencia que se vuelve significativa cuando se analizan los números absolutos (Figura 4.B)



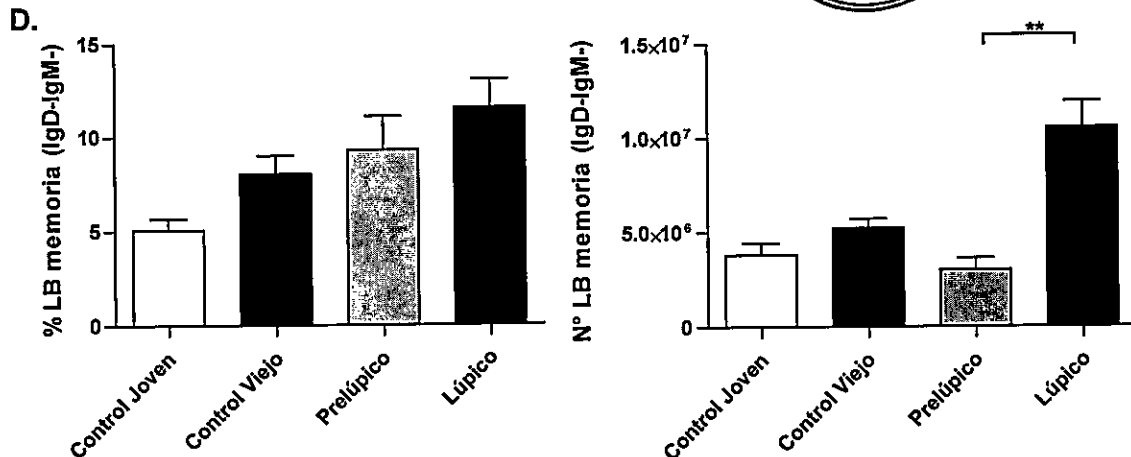


Figura 4. Subpoblaciones de Linfocitos B en el bazo de ratones controles jóvenes, prelúpticos, controles viejos y lúpicos. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de IgD e IgM en linfocitos B (CD19+CD11c-) de bazos de ratones controles jóvenes Balb/c (n=4), prelúpticos (n=6), controles viejos Balb/c (n=9) y lúpicos (n=13). B.C. y D. Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

La alta producción de auto-anticuerpos que presentan los ratones lúpicos debiera correlacionarse con un mayor estado de actividad de los LB y con una mayor presencia de LB en los centros germinales lo cual se evalúa mediante la expresión del marcador GL7. Observamos un aumento en la expresión de GL7 en LB de ratones lúpicos en comparación a LB de ratones prelúpticos (ver Anexos) y una alta presencia de células plasmáticas en el bazo de ratones lúpicos, definidas como B220-CD138 (Figura 5). En resumen el aumento de linfocitos B IgD-IgM- de memoria, una mayor presencia de LB en los centros germinales (GL7+) y gran presencia de células plasmáticas indicarían un mayor estado de activación de la respuesta humoral en el bazo de los ratones lúpicos.

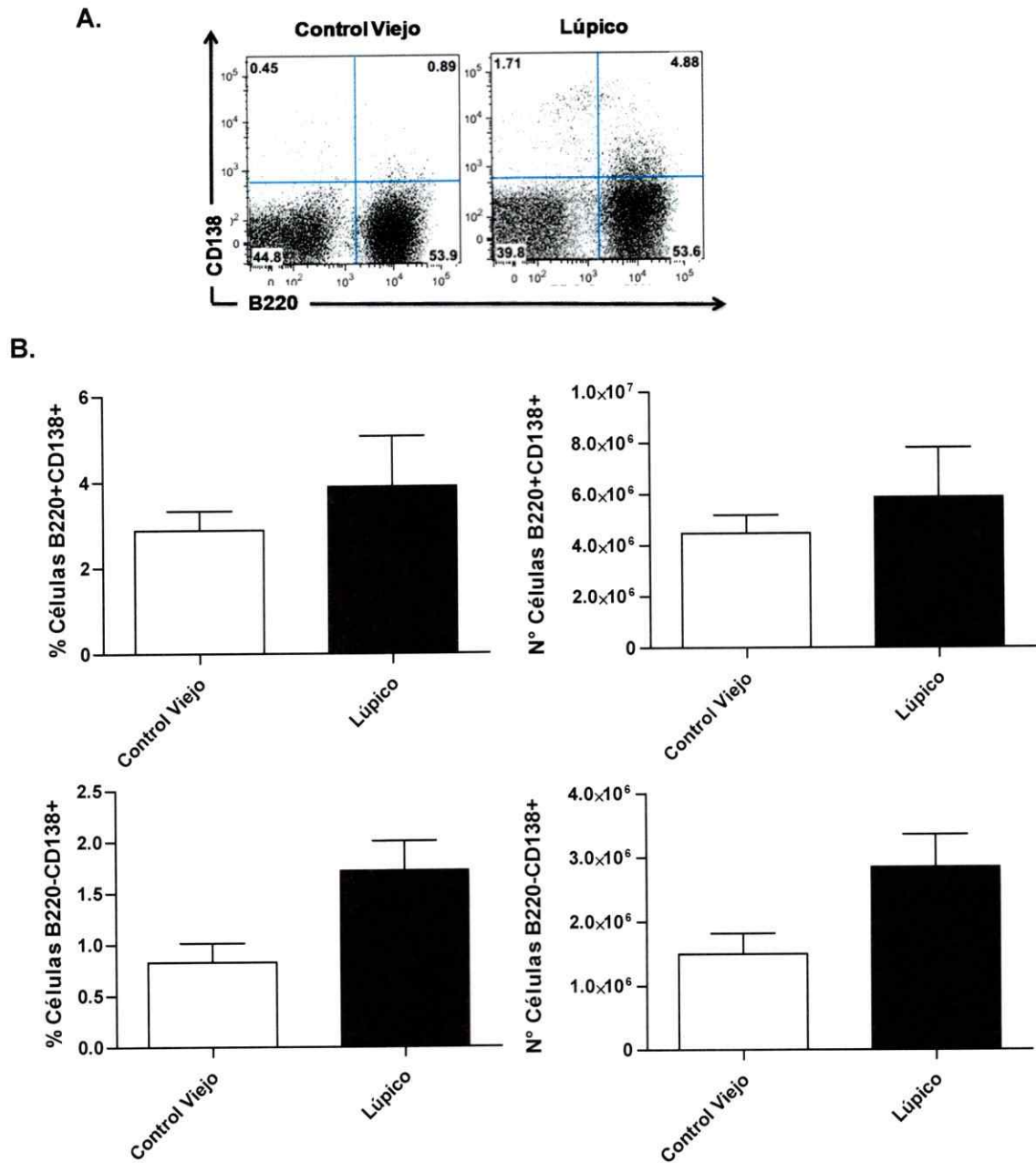
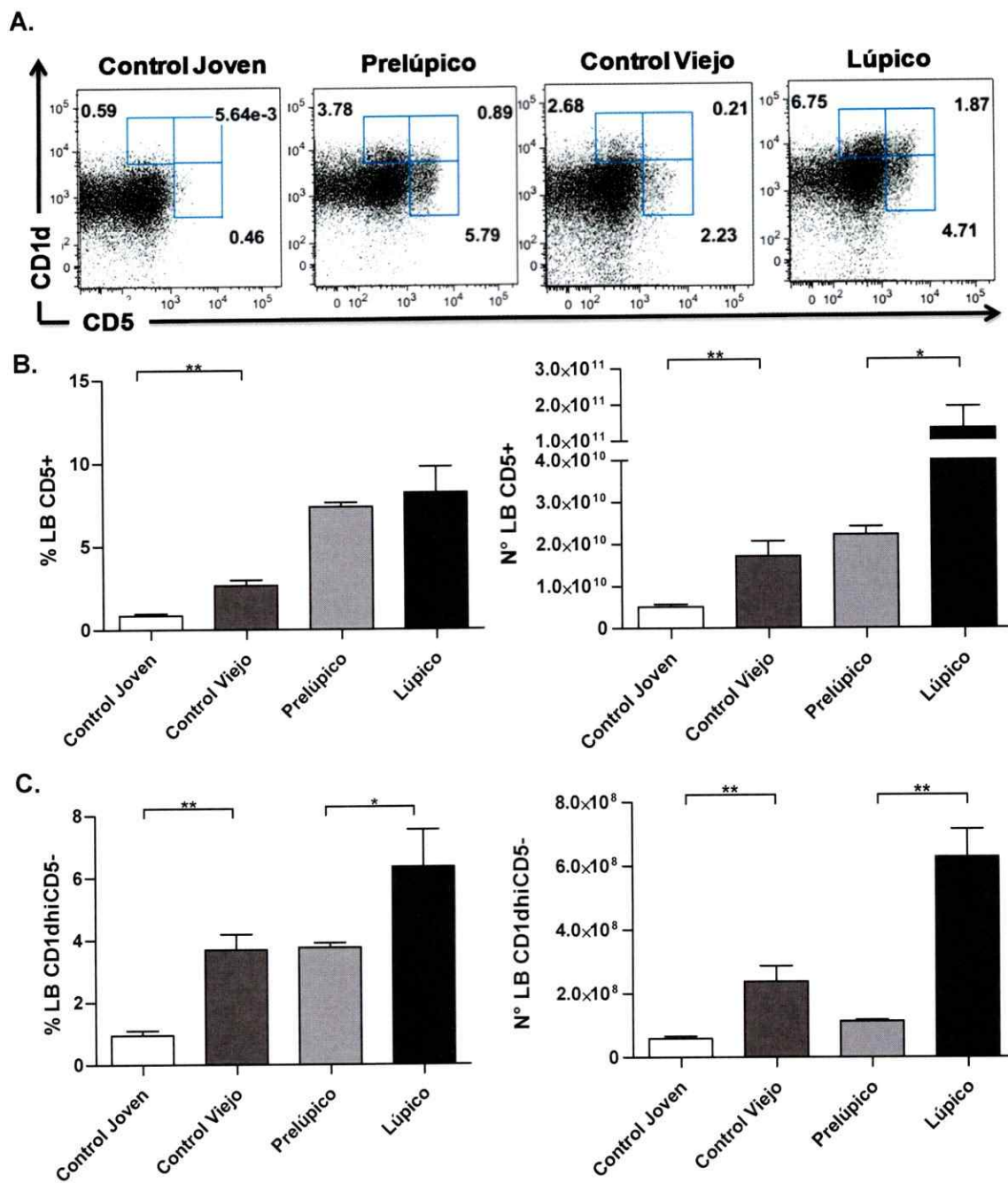


Figura 5. Ratones lúpicos presentan células plasmáticas en el bazo. **A.** Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD138 y B220 en el bazo de ratones controles Balb/c viejo (n=7) y lúpicos (n=6). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en **A.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los ratones lúpicos presentan un incremento en linfocitos T reguladores en el bazo

y que estos presentan una actividad supresora normal sobre LT *in vitro* (Gleisner y col., 2013). Estudios recientes han descrito la existencia de una población análoga en los LB que poseería función reguladora sobre LT. Específicamente, en relación a fenómenos de autoinmunidad se ha demostrado un aumento de LB reguladores. Los LB reguladores se caracterizan por su expresión de CD5 y CD1d. Cabe señalar que el marcador CD5 describe también a una sub-población particular denominada Linfocitos B1 que residen principalmente en la cavidad peritoneal. Se ha descrito que los ratones BWF1, presentan un fuerte incremento de esta sub-población de LB en numerosos órganos, debido a la incapacidad para permanecer en la cavidad peritoneal (Ishikawa y Matsushima, 2007). Al analizar la expresión de CD5 en los LB observamos un incremento significativo de LB CD5+ en ratones lúpicos y prelúpicos (Figura 6.B). Cuando analizamos en conjunto con el marcador CD1d determinamos que los LB reguladores (CD1dhi CD5+) están notablemente aumentados en ratones lúpicos comparados con los ratones prelúpicos. Puesto que el desarrollo del lupus se contradice con el aumento de LB reguladores estos resultados sugieren que la funcionalidad de los LB reguladores debe estar alterada. En la figura 6.C, D y E se muestra el análisis de la expresión de CD5 en los LB combinado con la expresión alta (hi) o mediana (mid) para CD1d donde, no es evidente cuál de todas estas poblaciones representa exactamente a los LB reguladores. Para los efectos de este trabajo los definimos como CD1dhi CD5+.



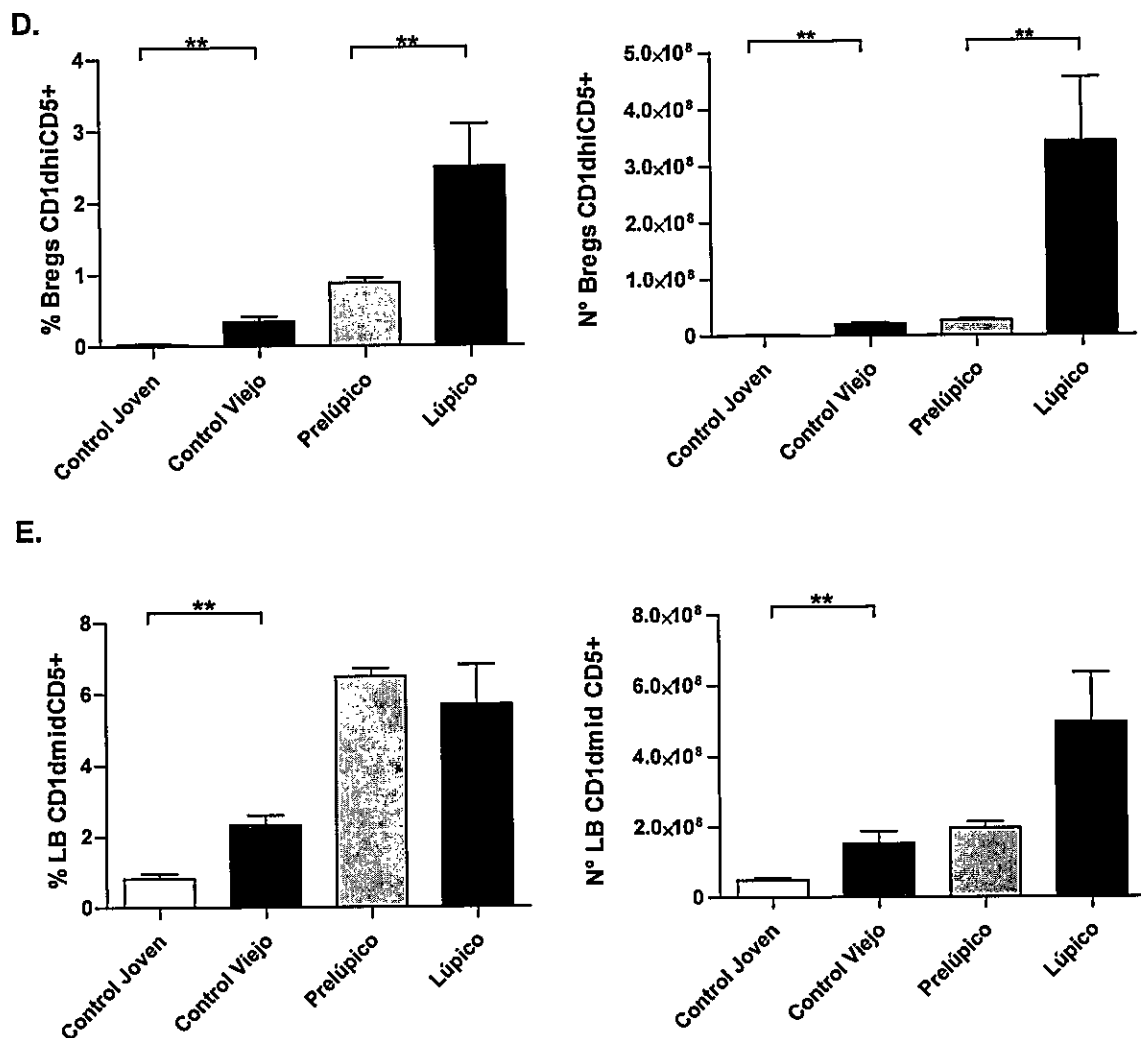


Figura 6. El bazo de ratones lúpicos presentan LB que expresan CD5 y linfocitos B reguladores CD1dhiCD5+. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD1d y CD5 de LB (CD19+CD11c-) de bazo de ratones controles jóvenes Balb/c (n=5), prelúpicos (n=5), controles viejos Balb/c (n=6) y lúpicos (n=8). B.C.D. y E. Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Con el objetivo de estudiar la funcionalidad de los LB reguladores analizamos la expresión de marcadores de co-estimulación y moléculas de MHC-II, moléculas importantes en la interacción con los LT. Al igual que con los

LB totales, en los LB reguladores lúpicos observamos la expresión de CD86, PD-L1, PD-L2 y MHC-II (ver Anexos).

La IL-10 es una citoquina con una potente función inmunosupresora. Esta citoquina influye específicamente en la supresión de respuestas inflamatorias, inhibiendo la maduración de las DC, en especial la producción de IL-12, citoquina característica de respuestas Th1 (Corinti y col., 2001).

Por otra parte, se ha descrito que los linfocitos B reguladores utilizarían principalmente la IL-10 para suprimir otras poblaciones efectoras, como LT. Por lo tanto, estudiamos la producción de IL-10 por los LB de ratones controles jóvenes, prelúpicos, controles viejos y lúpicos. Para esto se utilizó un protocolo descrito en la literatura (Yanaba y col, 2008), previamente explicado en Materiales y Métodos. En breve, se activaron esplenocitos totales durante 5 horas en presencia de LPS, PMA, Ionomicina más Golgi Stop (Monensina). Luego de este tiempo se analizó por citometría de flujo el porcentaje de LB (CD19+CD11c-) positivos para IL-10 intracelular. Los resultados demuestran un fuerte aumento en la cantidad de IL-10 intracelular en los LB provenientes de bazo de ratones lúpicos en comparación a ratones prelúpicos. Además se observó un incremento en la población de LB productores de IL-10 al comparar controles jóvenes con controles viejos lo que indicaría este fenómeno en parte también estaría asociado al proceso de envejecimiento (Figura 7)

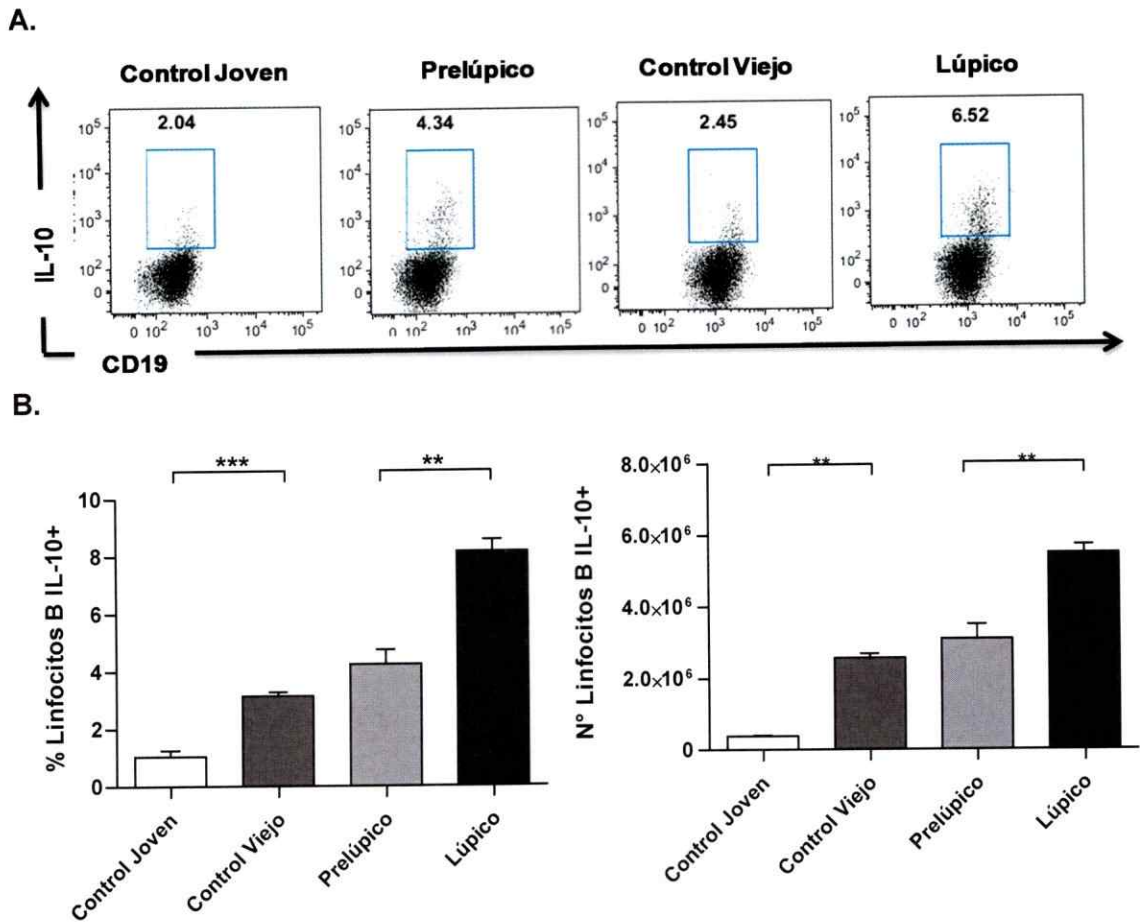
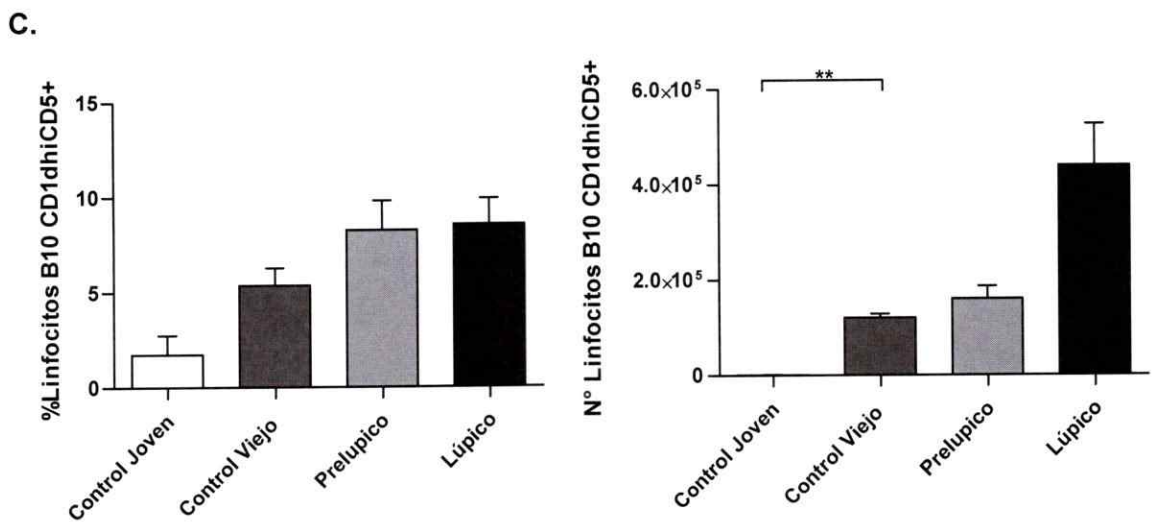
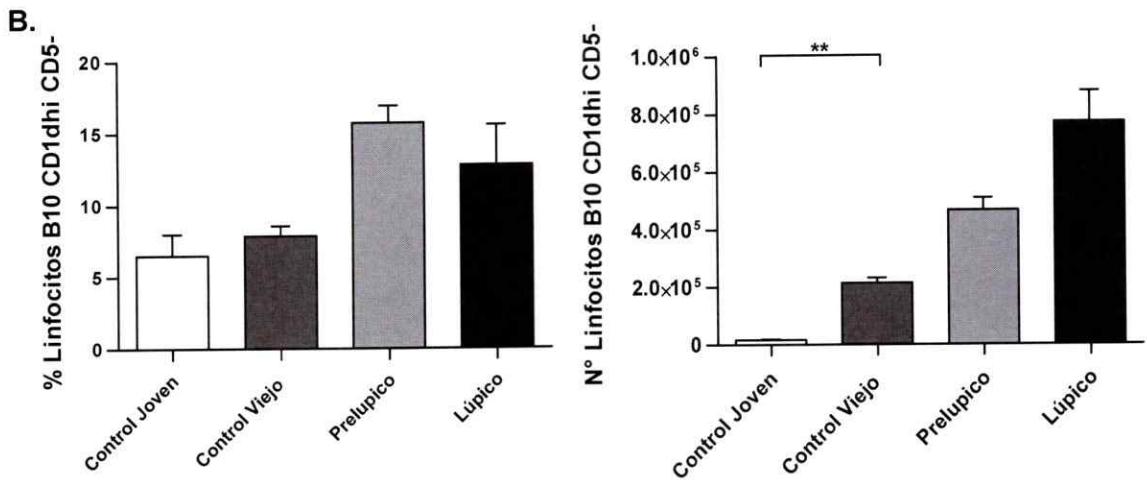
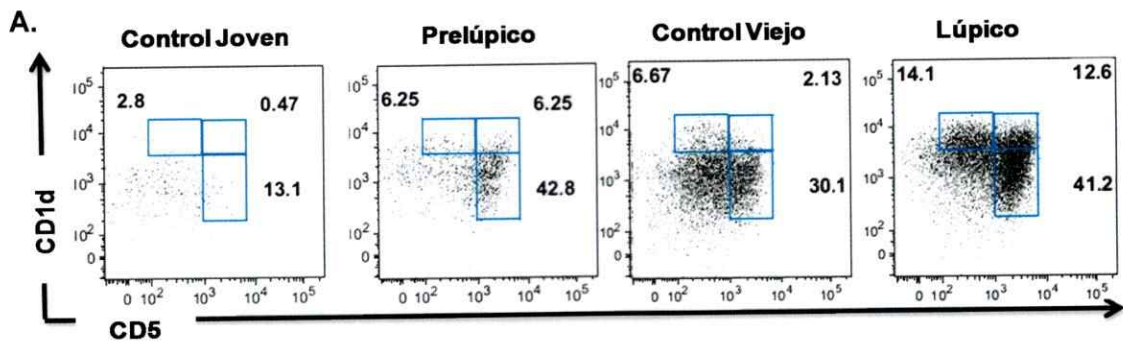


Figura 7. Los ratones lúpicos presentan LB productores de IL-10 en el bazo. A. Análisis de citometría de flujo intracelular de la población de LB productora de IL-10 realizada dentro de una ventana CD11c⁻ para descartar DC en bazo de ratones controles jóvenes Balb/c (n=7), prelúpicos (n=8), controles viejos Balb/c (n=8) y lúpicos (n=6). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en **A.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Además analizamos la expresión de los marcadores CD5 y CD1d en la población IL-10 positiva para los cuatro grupos de ratones. En la figura 8 se muestra que las células IL-10 positivas correlacionan fuertemente con la población CD5⁺ y en particular CD5⁺CD1dhi (LB reguladores).



D.

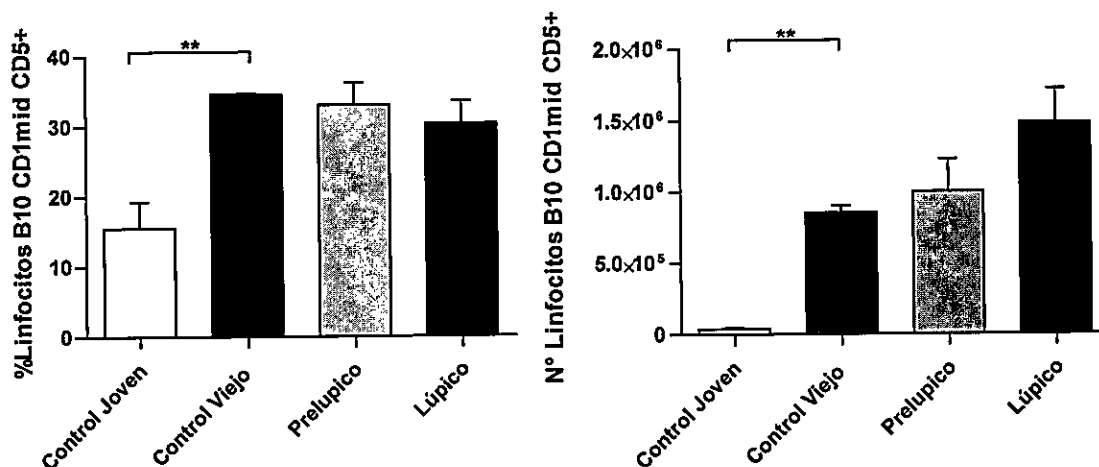


Figura 8. Correlación entre LB productores de IL-10 y de LB que expresan CD5 en el bazo de ratones lúpicos. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD5 y CD1d de la población de LB productora de IL-10 (CD19+CD11c-IL-10+) en bazo de ratones controles jóvenes Balb/c (n=5), prelúpicos (n=5), controles viejos Balb/c (n=5) y lúpicos (n=6). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

En resumen, los LB del bazo de ratones lúpicos presentan alteraciones tanto en su fenotipo como en la distribución de las diferentes subpoblaciones durante el desarrollo de la patología.

Además de su función de células presentadoras de antígeno, productoras de citoquinas y de anticuerpos, los LB presentan en su membrana una serie de receptores denominados TLR, cuya función es el reconocimiento de patrones presentes en variados microorganismos como bacterias y virus (Rawlings y col., 2012). La contribución de la señalización mediada por TLR a el desarrollo de enfermedades autoinmunes ha sido en parte demostrada en varios modelos murinos, donde la generación de la patología se ha visto es

dependiente de la acción de MyD88 señalizador maestro de la vía de TLR. (Silver y col., 2007) (Sadanaga y col., 2007)

Para abordar este objetivo purificamos LB de bazo de ratones controles viejos NZW/Balb/c y bazo de ratones lúpicos mediante selección negativa según descrito en Materiales y Métodos. Un resultado representativo de la purificación se muestra en la figura 9. Una vez purificados, los LB de cada grupo por separado fueron activados en presencia de distintos ligandos para TLR9 (CpG(B)), TLR4 (LPS), TLR3 (Poly I:C) y TLR7 (R848) durante 24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo se midió el nivel de activación de los LB por citometría de flujo de analizando la expresión de las moléculas CD86 y CD40 (Figura 10) y la producción de citoquinas en los sobrenadantes mediante la técnica de CBA (Figura 11).

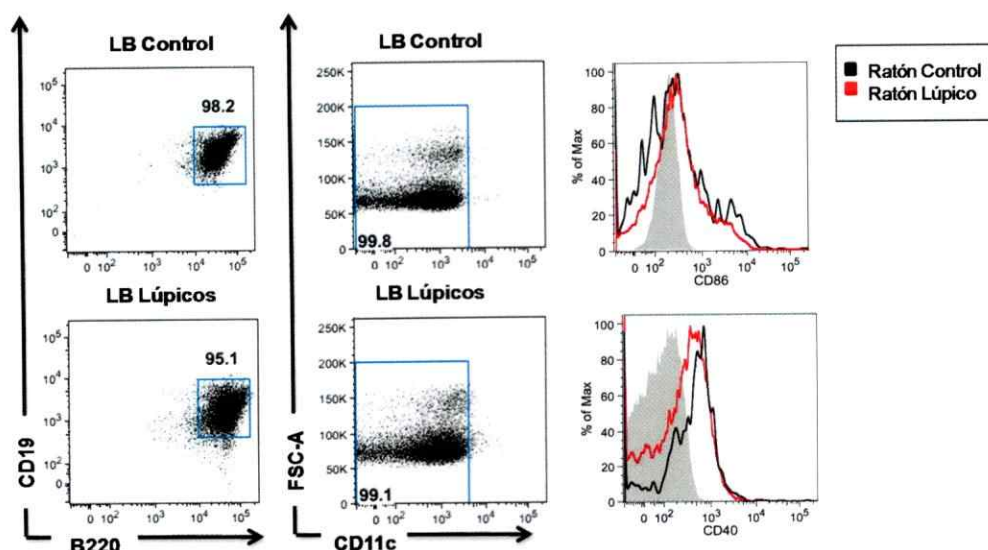


Figura 9. Fenotipo de la purificación de LB de ratones lúpicos y controles NZW/Balb/c. Linfocitos B de bazo de ratones lúpicos y controles NZW/Balb/c fueron purificados mediante selección negativa como fue previamente descrito en Materiales y Métodos.

Además se realizaron recuentos celulares en las distintas condiciones con el fin de evaluar la sobrevivencia de los LB tanto lúpicos como control sin observar diferencias entre ambos grupos. En cuanto a los niveles de activación de los LB luego del tratamiento con los ligandos de las TLR, solo se observaron diferencias para TLR9 y TLR3 sin embargo en ningún caso se observaron diferencias entre LB lúpicos y controles (Figura 15).

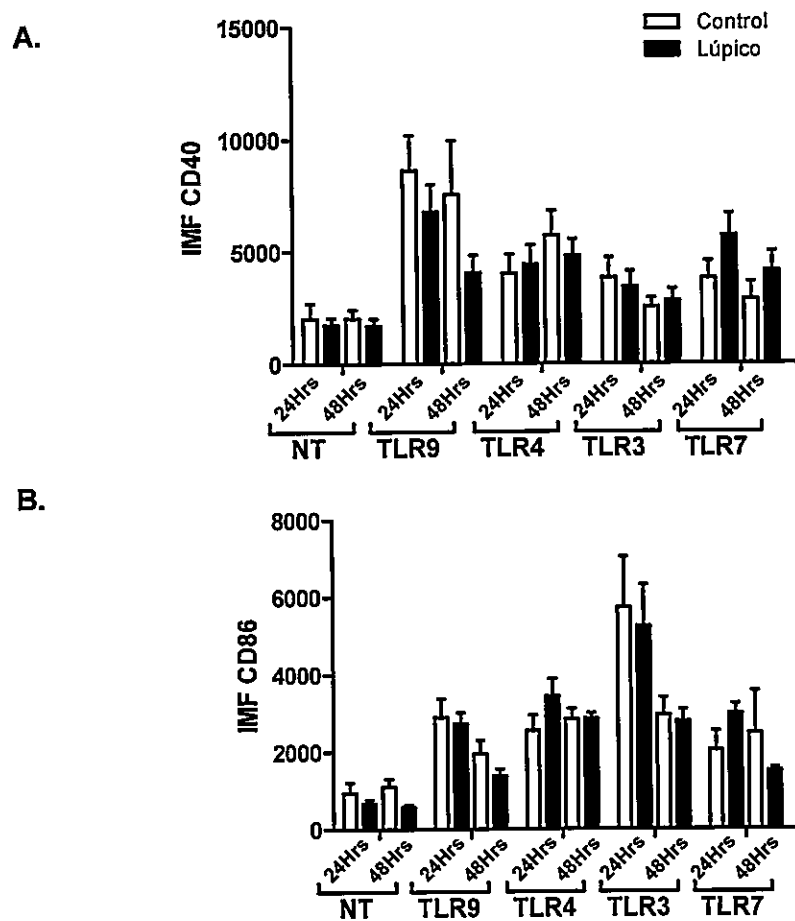


Figura 10. Linfocitos B de bazo de ratones control y lúpicos presentan similares niveles de expresión de CD40 y CD86 luego de 24hrs o 48hrs de activación con distintos ligandos para TLR. A. Cuantificación de la IMF para CD40 en linfocitos B (CD19+B220+) luego de 24hrs y 48hrs luego de la activación en presencia de distintos ligandos para TLR. **B.** Cuantificación de la IMF para CD40 en linfocitos B (CD19+B220+) luego de 24hrs y 48hrs luego de la activación en presencia de distintos ligandos para TLR. En barras negras LB ratón lúpico (n=5), en blancas LB ratón control NZW/Balb/c (n=4). *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Por otra parte en cuanto a la producción de citoquinas primero cabe señalar que solo fue posible detectar IL-6, IL-10 y TNF- α , mientras que los niveles de IL-12, IFN- α y MCP-1 se registraron bajo el nivel de detección. Se detectaron diferencias en la producción de IL-6 cuando los LB fueron activados con el ligando de TLR9. Sorpresivamente LB de bazo de ratones lúpicos presentaron menores niveles de producción que LB de ratones control. Por otra parte, en concordancia con resultados mostrados previamente se muestra una tendencia por parte de los LB lúpicos a producir mayores niveles de IL-10 en presencia de ligandos de TLR, esta es estadísticamente significativa solo en el caso de ligando para TLR3 (Figura 11).

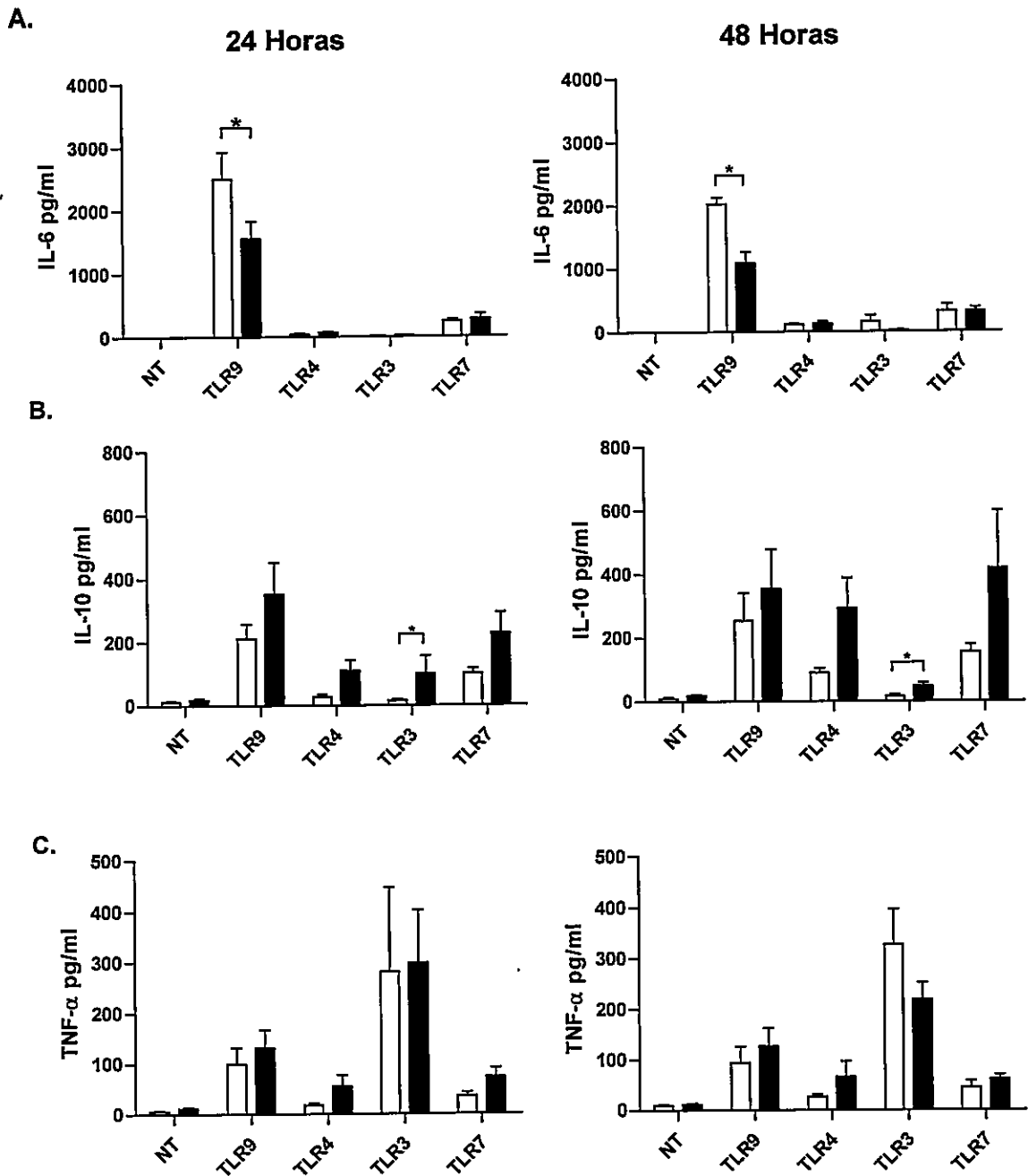


Figura 11. Linfocitos B de bazo de ratones control y lúpico presentan similares niveles de producción de citoquinas luego de 24/48hrs de activación con distintos ligandos para TLR. Cuantificación de la producción de **A.** IL-6 **B.**IL-10 **C.**TNF- α por LB de ratones controles NZW/Balb/c (n=4, barras blancas) y lúpico (n=8, barras negras) luego de 24-48 horas de activación en presencia de distintos ligandos de TLR. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

4.2. Linfocitos B tímicos presentan alteraciones durante el desarrollo del lupus.

Estudios previos en el modelo murino BWF1, demostraron alteraciones en el homing de LB de ratones lúpicos, específicamente LB B-1 provenientes de la cavidad peritoneal, el estudio demostró que los LB B-1 migran hacia órganos blanco como los riñones y el timo en forma anormal. Además el estudio demuestra que estas células poseerían una alta capacidad de presentación antigénica y activarían principalmente LT auto reactivos (Ishikawa y Matsushima, 2007).

En base a esto, analizamos el fenotipo y distribución de los LB en el timo de ratones controles jóvenes, prelúpicos, controles viejos y lúpicos.

Lo primero que resalta al analizar este órgano en los distintos grupos es que la celularidad del timo de los ratones lúpicos se encuentra claramente disminuida en comparación a ratones prelúpicos (Figura 12.A). Esto es detectable rápidamente de manera visual al presentar órganos claramente más pequeños en comparación al resto de los grupos. Registros de fenómenos similares han sido descritos en la literatura asociados a procesos inflamatorios donde el timo sufre una reducción de tamaño y celularidad, acompañado de un aumento en la entrada de distintas poblaciones de LT y LB, fenómeno que en estados normales prácticamente es inexistente (Hodge y col., 2012). Al analizar la población de LB totales presentes en el timo, los ratones lúpicos presentan un gran aumento en el porcentaje y número absoluto (Figura 12.B y C).

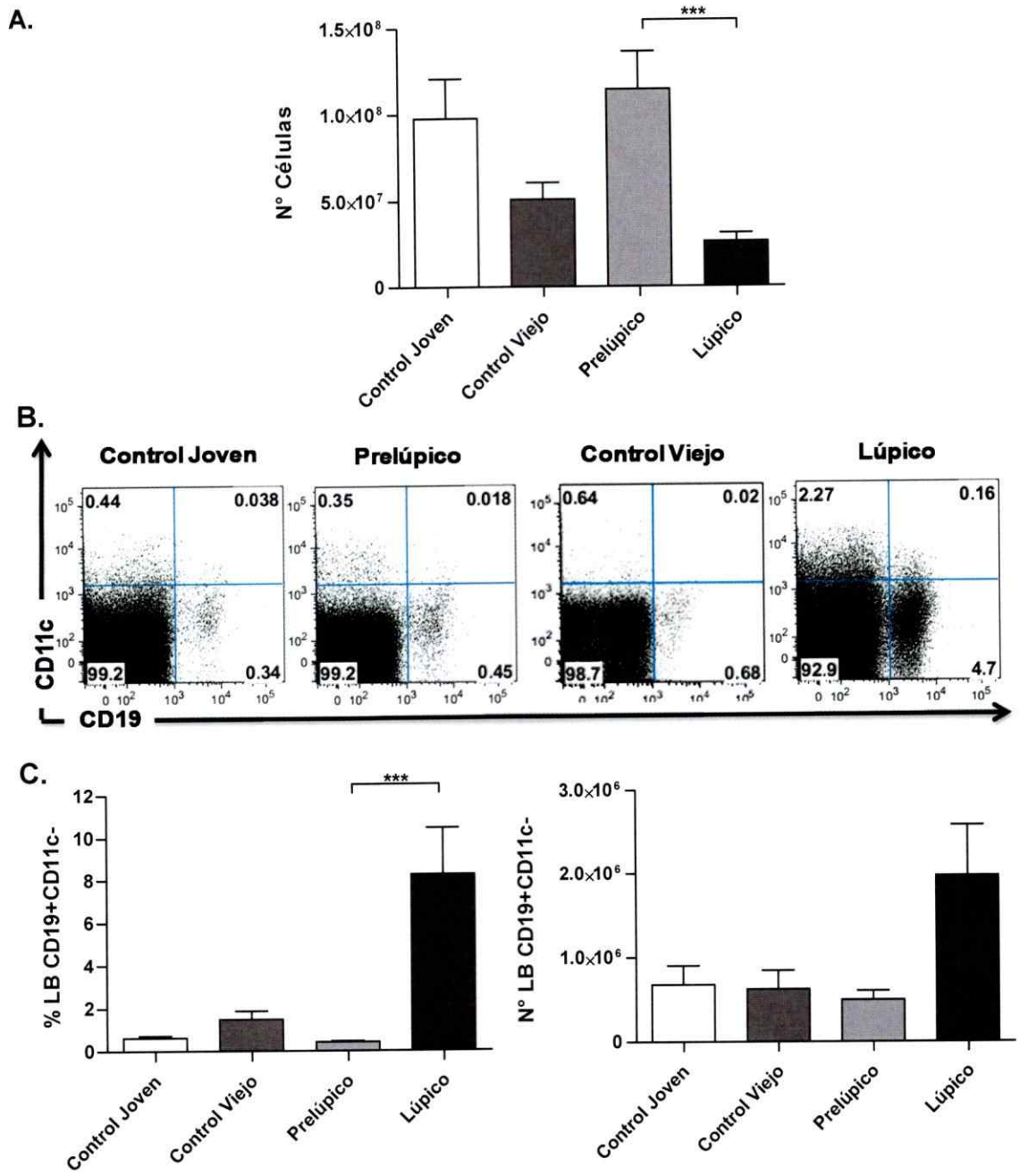


Figura 12. Disminución de la celularidad y aumento en el porcentaje de LB en el timo de ratones lúpicos. **A.** Cuantificación del número total de células obtenidas por timo para ratones control joven Balb/c (n=5), prelúpico (n=6), control viejo Balb/c (n=10) y lúpico (n=17). **B.** Análisis de citometría de flujo de la población de LB (CD19⁺CD11c⁻) en el timo de ratones de los distintos grupos. **C.** Cuantificación de los resultados mostrados en B. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Trabajos anteriores (Ishikawa y Matsushima, 2007) postulan que los LB B1 CD5+ peritoneales migran anormalmente hacia otros órganos como el timo. En consecuencia, analizamos la presencia de la población de LB CD5+ en el timo. Nuestros resultados muestran que no existe diferencia en el porcentaje de LB CD5+ tímicos de los ratones prelúpicos y lúpicos, ni entre controles jóvenes y viejos. Todos los grupos presentaron entre 10-15% de LB CD5+ en el timo. Por tanto el aumento que se observa en los timos de ratones lúpicos no se debe exclusivamente a un aumento en la población de LB CD5+ (Figura 13).

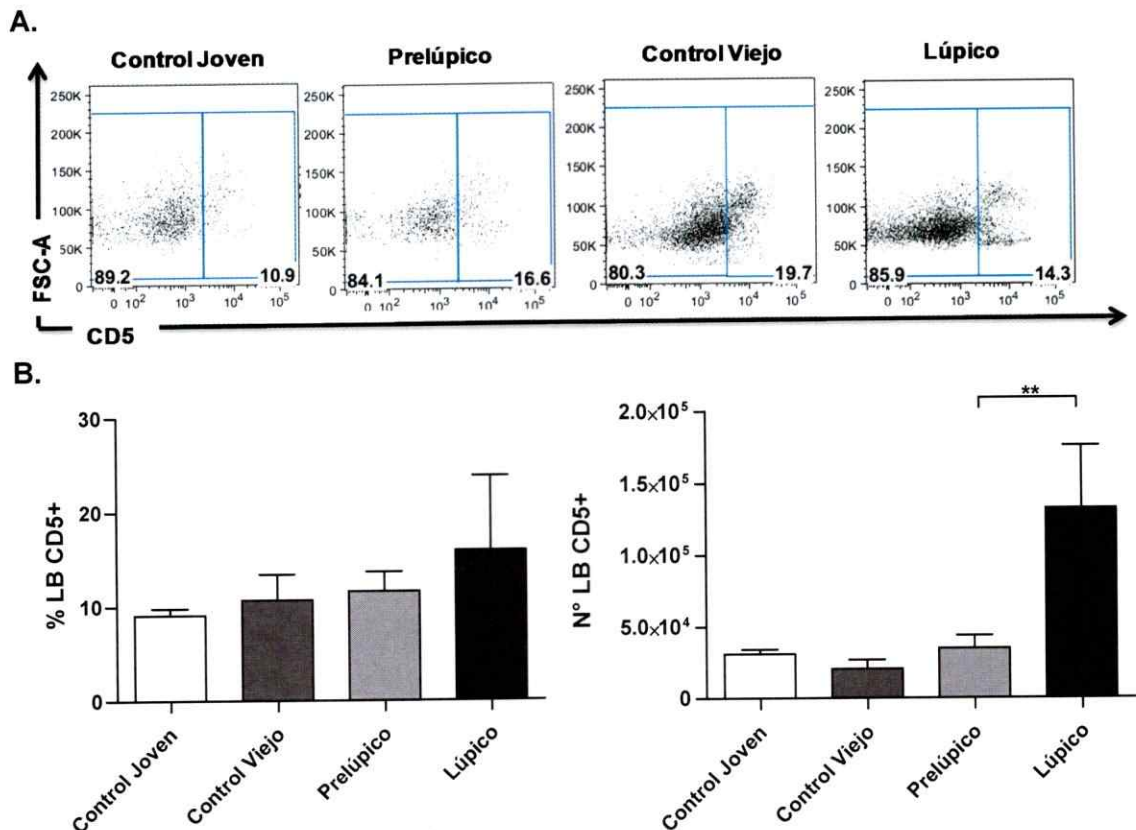
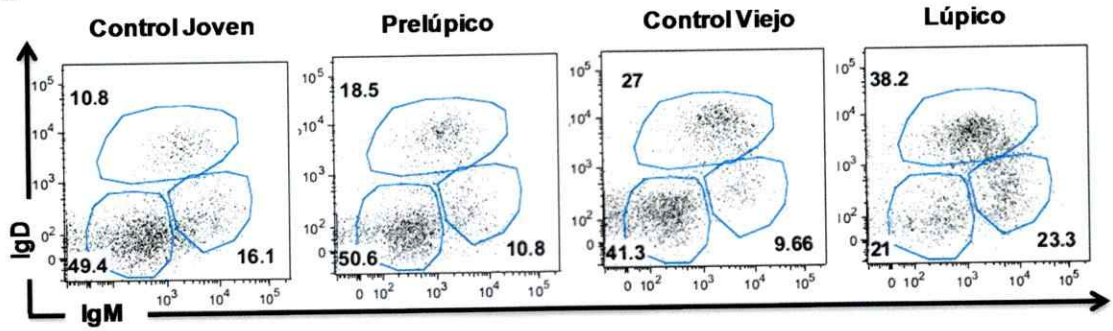


Figura 13. En el timo de ratones lúpicos existen poblaciones de LB que no expresan CD5. **A.** Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD5 en LB (CD19+CD11c-) de timo de ratones control joven Balb/c (n=5), prelúptico (n=6), control viejo Balb/c (n=6) y lúpico (n=5). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001

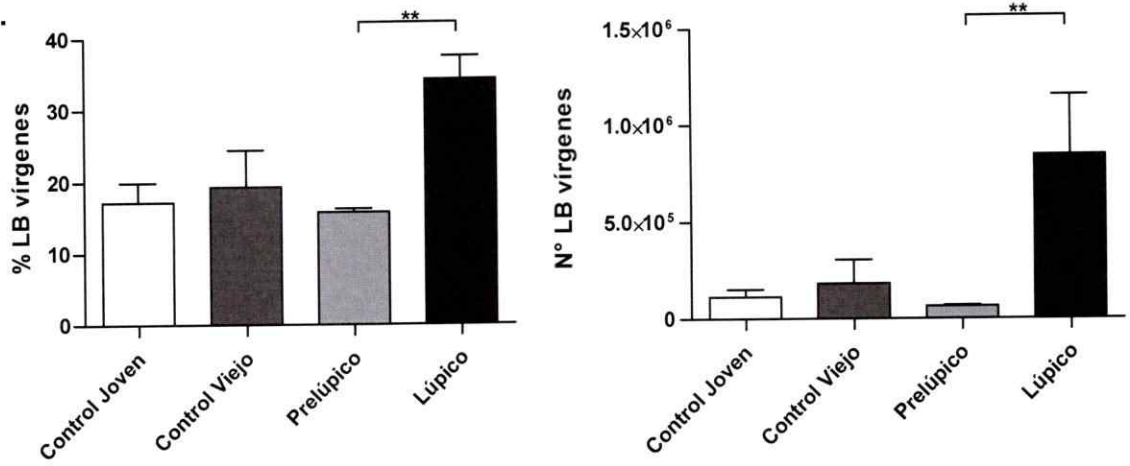
La función de los LB tímicos es controversial y en algunos trabajos se les involucra con la generación de tolerancia central en el timo, mediante procesos de selección de negativa de timocitos o con la generación de linfocitos T reguladores tímicos (Perera y col., 2013) (Guerri y col., 2013). Puesto que la generación de tolerancia en LT CD4+ depende de la expresión de moléculas MHC-II, analizamos en los LB tímicos la expresión de MHC-II (IA2). Nuestros resultados demuestran que los linfocitos B lúpicos expresan MHC-II en su superficie (ver Anexos).

Al analizar la distribución de las distintas subpoblaciones de linfocitos B en relación a la expresión de IgD e IgM observamos que los timos de los ratones lúpicos presentan un aumento, en porcentaje y números absolutos, en la población de LB vírgenes en comparación a ratones prelúpicos (Figura 14.B). En cambio presentan una disminución de la población de LB de memoria (IgD-IgM-) en el timo de los ratones lúpicos en comparación a ratones prelúpicos (Figura 14.D). En cuanto a la población IgM+, se observa que el porcentaje de esta población con la edad disminuye notablemente como se observa al comparar controles jóvenes y viejos, mientras que este fenómeno no se observa al comparar ratones prelúpicos y lúpicos (Figura 14.C). Sin embargo, existe se observa un aumento importante en esta población en los ratones lúpicos cuando se consideran los números absolutos.

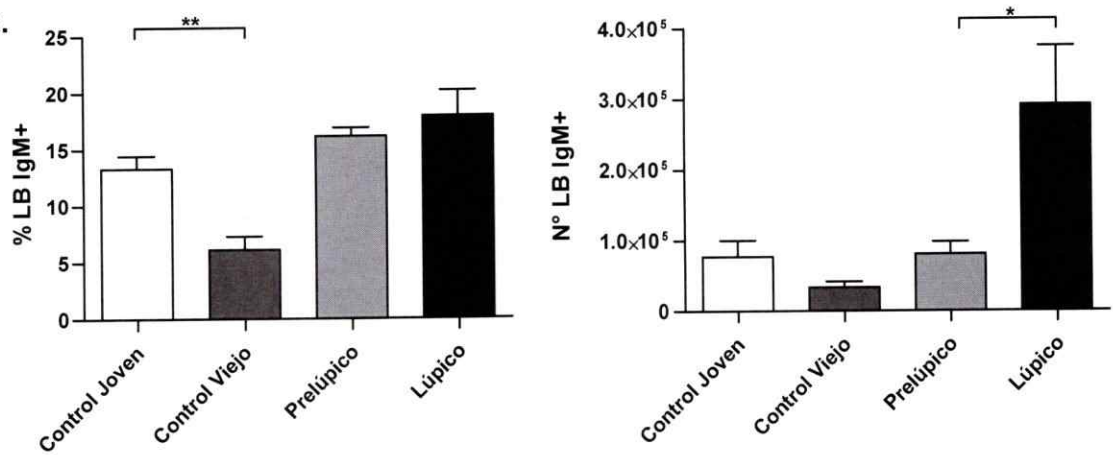
A.



B.



C.



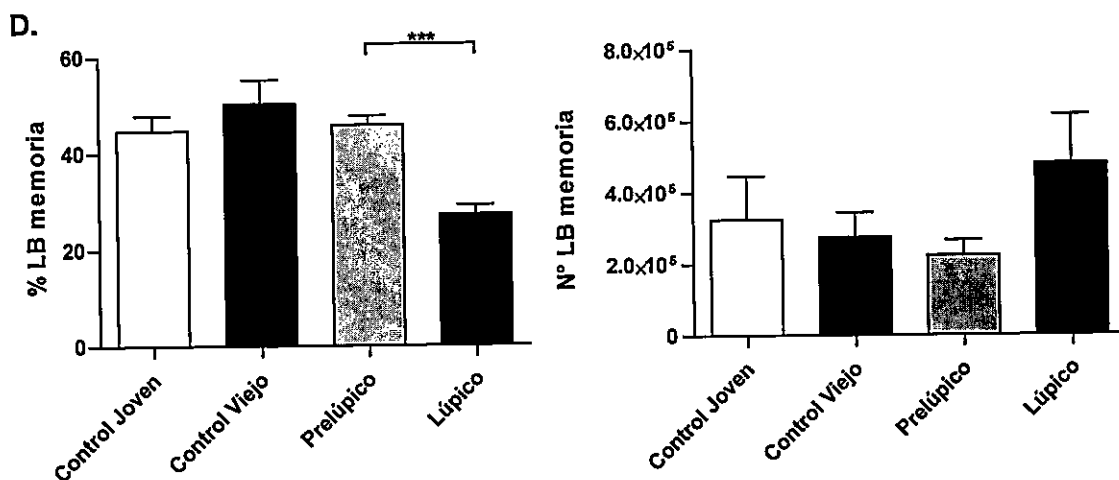


Figura 14. Subpoblaciones de Linfocitos B en el timo de ratones controles jóvenes, prelúpicos, controles viejos y lúpicos. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de IgD e IgM en linfocitos B (CD19+CD11c-) de bazo de ratones controles jóvenes Balb/c (n=9), prelúpicos (n=6), controles viejos Balb/c (n=10) y lúpicos (n=17). B.C. y D. Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

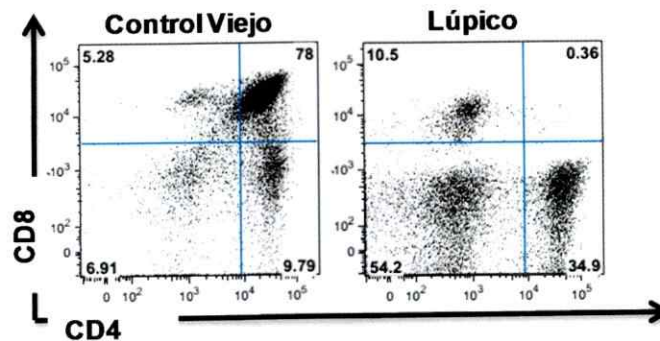
Enseguida analizamos la presencia de células plasmáticas y de marcadores de centro germinal en el timo de estos ratones. Estudiamos la expresión de B220 y CD138; las células B220+CD138+ corresponden a plasmablastos, células en etapa de diferenciación hacia células plasmáticas y las células B220-CD138+ corresponden a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Al analizar estos marcadores se observó la presencia tanto de plasmablastos como de células plasmáticas en el timo de los ratones lúpicos (ver Anexos).

En el timo de todos los grupos de ratones analizados fue posible observar una población de LB que expresan el marcador GL7. Cabe destacar que el porcentaje de LB GL7+ en el timo es considerablemente mayor al porcentaje de esta población existente en el bazo (alrededor de 4% en bazo comparado a 10-

20% en el timo). No se registraron diferencias al comparar la expresión de este marcador en LB tímicos de ratones prelúpicos y lúpicos (ver Anexos).

Trabajos previos, así como resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que los ratones lúpicos presentan una fuerte disminución en la población de timocitos CD4+CD8+ (Figura 15) (Ishikawa y col., 2001).

A.



B.

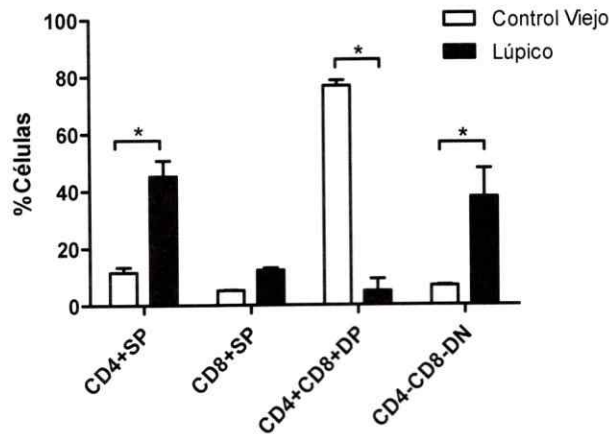


Figura 15. Timos de ratones lúpicos carecen de timocitos CD4+CD8+DP **A.** Análisis de Citometría de flujo de la expresión de CD4 y CD8 en timo de ratones controles viejos NZW/Balb/c (n=3) y lúpicos (n=3). **B.** Cuantificación de los resultados obtenidos en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Para dilucidar la función de los LB tímicos se realizaron co-cultivos de timocitos purificados de ratones controles viejos NZW/Balb/c que fueron depletados de APCs con LB purificados mediante cell sorter a partir de timo y bazo de ratones lúpicos. En los Anexos se muestra el fenotipo inicial de los timocitos previo al co-cultivo.

Luego de 5 días de cocultivo en presencia de anticuerpo anti-CD3 se recuperaron las células y se analizaron mediante citometría de flujo. La recuperación celular de estos cultivos fue baja ($0,1 \times 10^6$ cel/ml aproximadamente por condición) esto debido a que solo parte de los timocitos puestos en cultivo expresa CD3 en su superficie y es capaz de ser activado por efecto del anticuerpo utilizado. Analizamos la expresión de CD4 y CD8 en las distintas condiciones. Observamos que luego del co-cultivo desaparece la población de timocitos CD4+CD8+ que inicialmente alcanzaba un 70%, esta disminución incluso es mayor en presencia de LB de timo o de bazo lúpicos. Con respecto a las otras poblaciones no se observaron diferencias entre las distintas condiciones de co-cultivo (Figura 16).

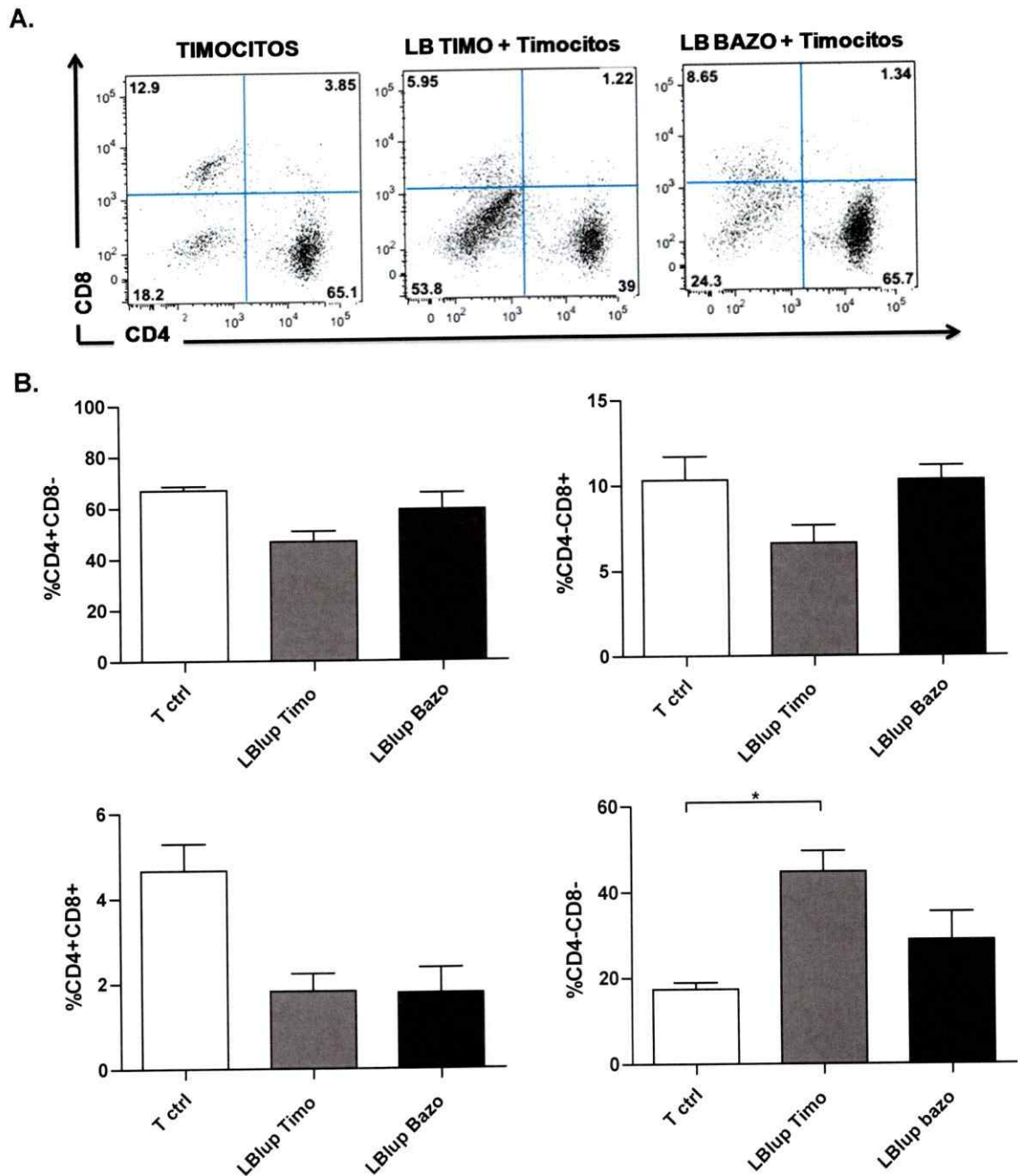
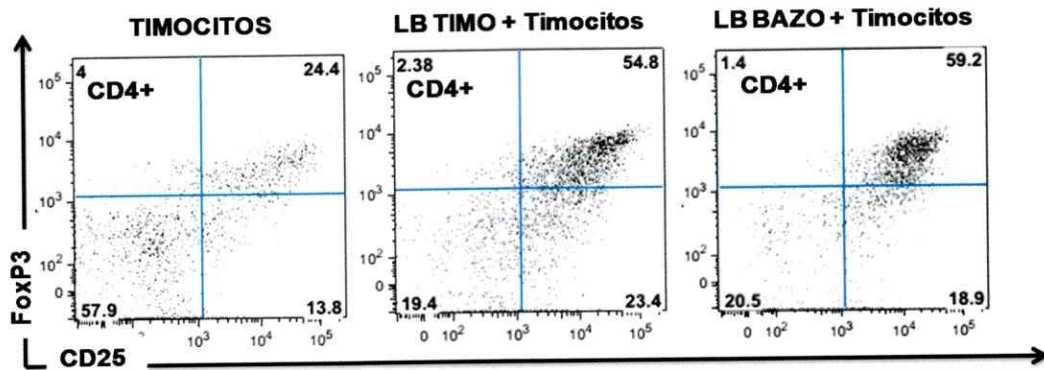


Figura 16. Linfocitos B de timo como de bazo lúpicos presentan una interacción similar con timocitos control. Se realizaron cocultivo de LB purificados de bazo o timo de ratones lúpicos y se cocultivaron en conjunto con timocitos provenientes de ratones controles viejos NZW/Balb/c depletados de APC en presencia de anticuerpo anti-CD3 (1ug/ml). **A.** Análisis de citometría de flujo de las distintas condiciones luego de los 5 días de cocultivo. Se muestra resultado representativo de la expresión de CD4 y CD8. **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Además analizamos la expresión del factor transcripcional FoxP3, marcador clave de los LT reguladores. LB de timo o de bazo de ratones lúpicos poseen la capacidad de inducir un aumento en la expresión de FoxP3 en timocitos (Figura 17).

A.



B.

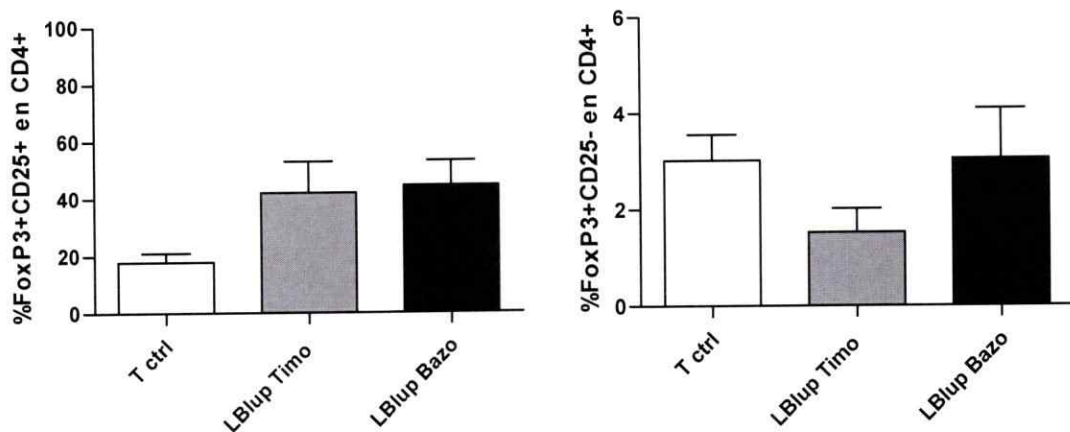


Figura 17. Linfocitos B de timo como de bazo lúpicos poseen la capacidad de inducir un aumento en los Tregs a partir de Timocitos depletados de APC A. Análisis de citometría de flujo de las distintas condiciones luego de los 5 días de cocultivo. Se muestra resultado representativo de la expresión de FoxP3 y CD25 a partir de una ventana CD4+. **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

4.3. Transferencia adoptiva de DC de bazo lúpicas o controles a ratones prelúpicos.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que las DCs durante el desarrollo del lupus presentan mayores niveles de activación y alteraciones en su homing a distintos órganos linfoides (Gleisner y col., 2013). En base a estos resultados y debido al rol fundamental que poseen estas células en la respuesta inmune, se realizaron transferencias adoptivas de DC purificadas mediante cell sorter a partir de bazo de ratones lúpicas o controles viejos NZW/Balb/c en ratones prelúpicos de 2 meses de edad que no presentaban signos de enfermedad. Se inyectaron dos dosis de 4×10^6 DC, en el día cero y día 21. Durante este período tomamos muestras de sangre de todos los individuos y medimos mediante ELISA la presencia de auto-anticuerpos. Una vez alcanzado el día 60 se sacrificaron los animales y se analizaron distintos órganos mediante citometría de flujo.

Al comparar el resultado de los ELISA entre ambos grupos se observó que aquellos ratones prelúpicos inyectados con DC de ratones lúpicas presentaron mayores niveles de auto-anticuerpos dsADN que aquellos ratones prelúpicos inyectados con DC control (Figura 18).

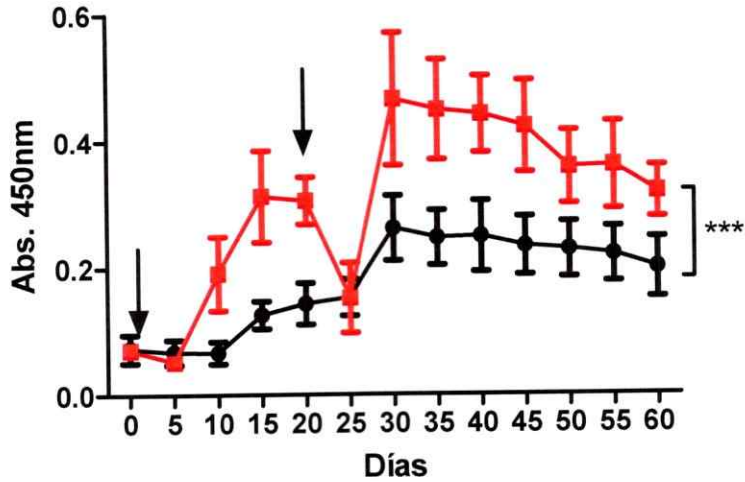


Figura 18. La transferencia adoptiva de DC provenientes de ratones lúpicos induce un aumento en la producción de auto-anticuerpos en ratones prelúpicos. Se realizaron mediciones en sangre cada 15 días mediante ELISA. En rojo se muestran los resultados obtenidos para el grupo de ratones prelúpicos inyectados con DC de ratones lúpicos (n=4) y en negro los inyectados con DC de ratones control (n=4). Las flechas muestran las dos dosis de DC. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

De cuatro ratones por grupo, dos del grupo tratado con DC lúpicas presentaron esplenomegalia fenómeno relacionado al LES. Se detectaron porcentajes normales de LB en el bazo de ambos grupos, sin embargo al analizar su fenotipo se observó un aumento en la activación de los LB, mayores niveles de expresión de PD-L1, PD-L2 y CD86, en el bazo de los ratones tratados con DC provenientes de un ratón lúpico. Sin embargo, cuando se analizó la expresión de MHC-II en los LB de bazo se observó que la inyección de DC provenientes de un ratón lúpico generó una disminución en la expresión de MHC II (Figura 19).

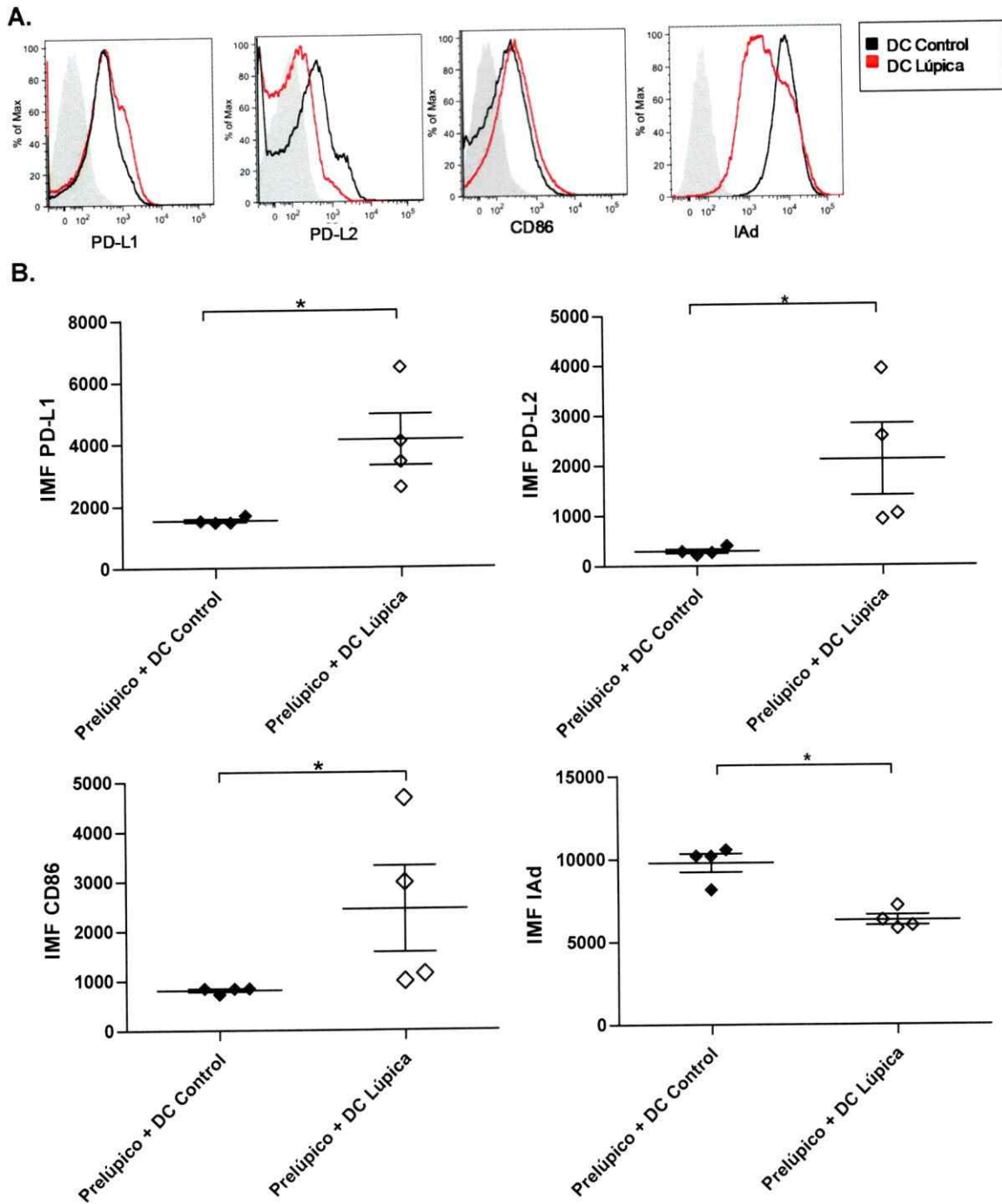


Figura 19. Linfocitos B de bazo de ratones prelápicos tratados con DC de ratones lúpica presentan un mayor estado de activación y una menor expresión de MHC-II. **A.** Superposición de histogramas de fluorescencia para PD-L1, PD-L2, CD86 e IAd en LB totales (CD19+CD11c-) de un ratones prelápicos inyectado con DC control (negro) (n=4) o DC lúpica (rojo) (n=4). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en **A.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Luego, analizamos la distribución de las distintas poblaciones de LB en base a su expresión de Igs en la superficie. El tratamiento con DC de ratones lúpicos causó un aumento en la población de LB IgM+ en desmedro de la población de LB vírgenes (IgD+ IgM+) (Figura 20.B).

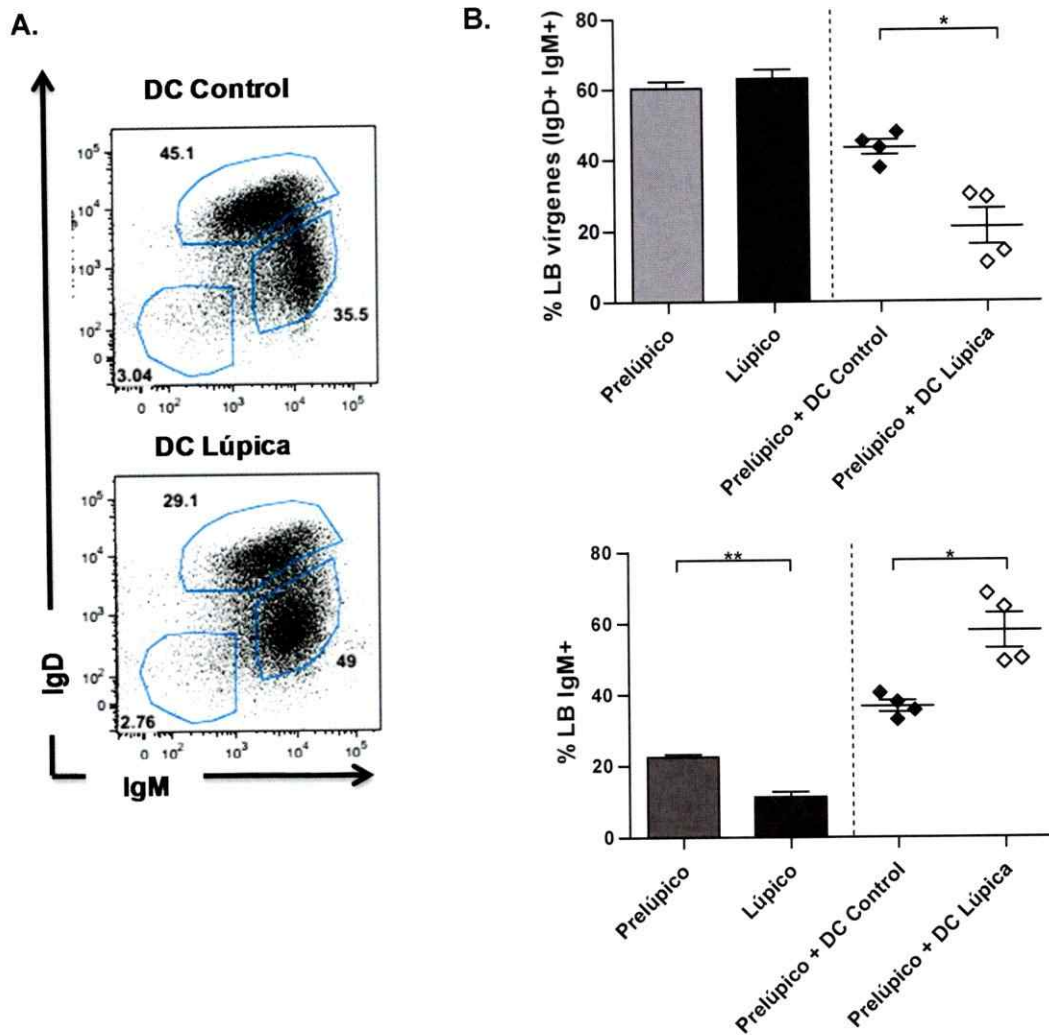


Figura 20. Los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan una disminución de LB vírgenes y un aumento de IgM+ en los LB de bazo. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de IgD e IgM en la población de LB (CD19+CD11c-) en el bazo de ratones prelúpicos inyectados con DC de ratones control (n=4) o DC de ratones lúpicos (n=4). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Al analizar la expresión de CD5 en los LB de bazo se observó un aumento en la expresión de esta molécula en los LB provenientes de bazo de ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos (Figura 21.B). El aumento de esta población de LB CD5+ también se observó en sangre y coincide con una disminución en la expresión de B220 fenotipo que corresponde con LB B-1 (B220lo CD5+) (resultados no mostrados). Además estudiamos en conjunto con CD5 la expresión de CD1d para analizar la presencia de LB reguladores. Como se observa en la figura 31, el tratamiento con DC de ratones lúpicos indujo además de la expresión de CD5, la expresión de CD1d en los LB de bazo y una desaparición de la población CD1dhiCD5-. Este fenómeno también se observa al comparar ratones prelúpicos y lúpicos (Figura 21.A y B).

Previamente demostramos que el aumento en la población de LB CD5+ en los ratones lúpicos está asociado a un aumento en la producción de IL-10. Por esto analizamos la producción de IL-10 por los LB de bazo de los ratones tratados con los distintos tipos de DC. En breve, se obtuvieron esplenocitos de ratones prelúpicos tratados con los distintos tipos de DC y se activaron durante 5 horas en presencia de LPS + PMA + Ionomicina + Golgi Stop, luego se realizó marcaje intracelular y se analizó mediante citometría de flujo. Los ratones tratados con DC de ratones lúpicos presentaron una tendencia al aumento en la población de LB IL-10+ en el bazo, incluso a niveles mayores de lo que se observa en ratones lúpicos (Figura 22).

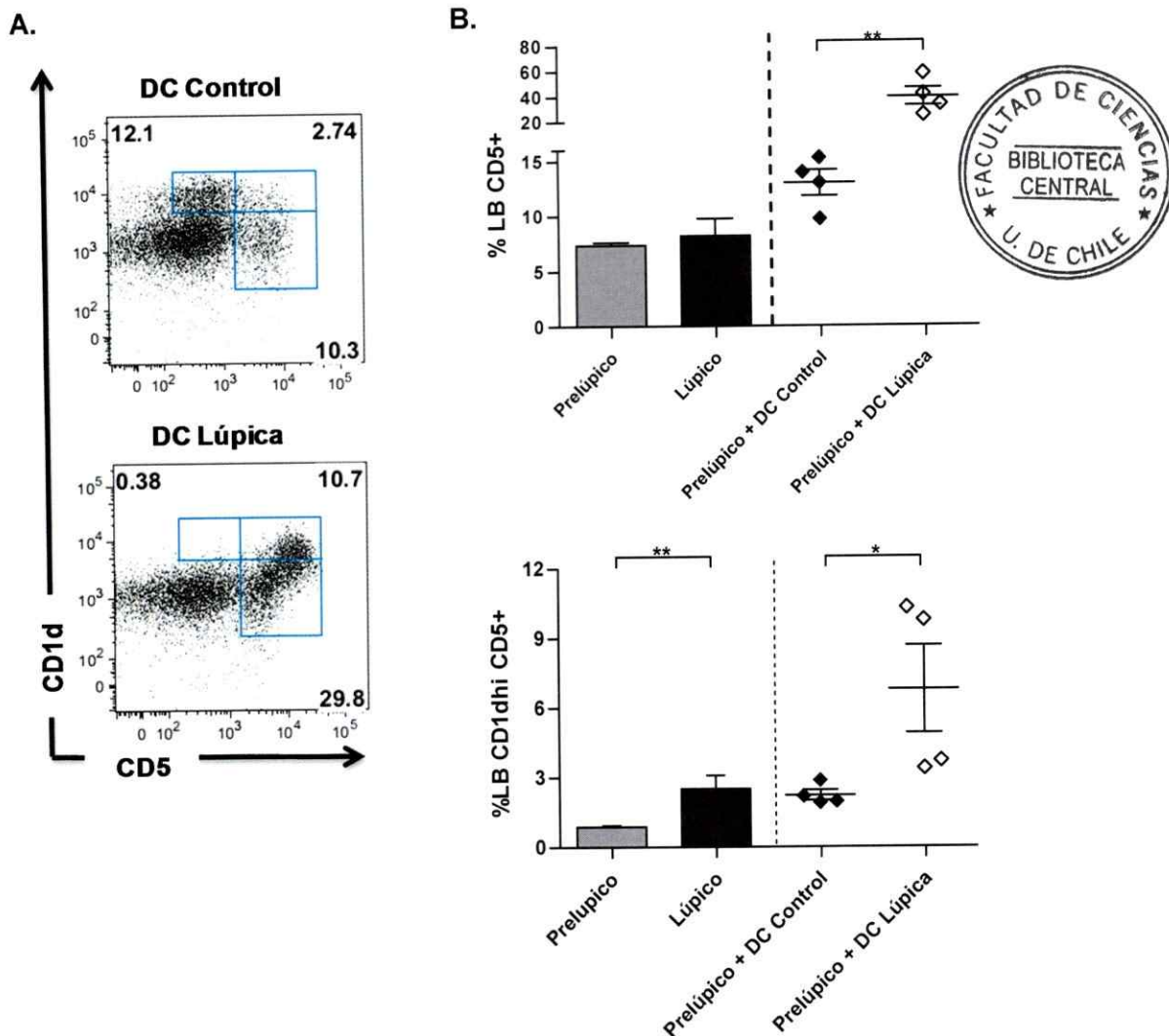


Figura 21. Los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan un aumento en la población de linfocitos B CD5+ y Linfocitos B reguladores en el bazo. A. Análisis de citometría de flujo de la población de linfocitos B (CD19+CD11c-) en el bazo de ratones prelúpicos inyectados con DC de ratones control (n=4) o DC de ratones lúpicos (n=4). Se muestra la expresión de CD5 y de CD1d en LB totales **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

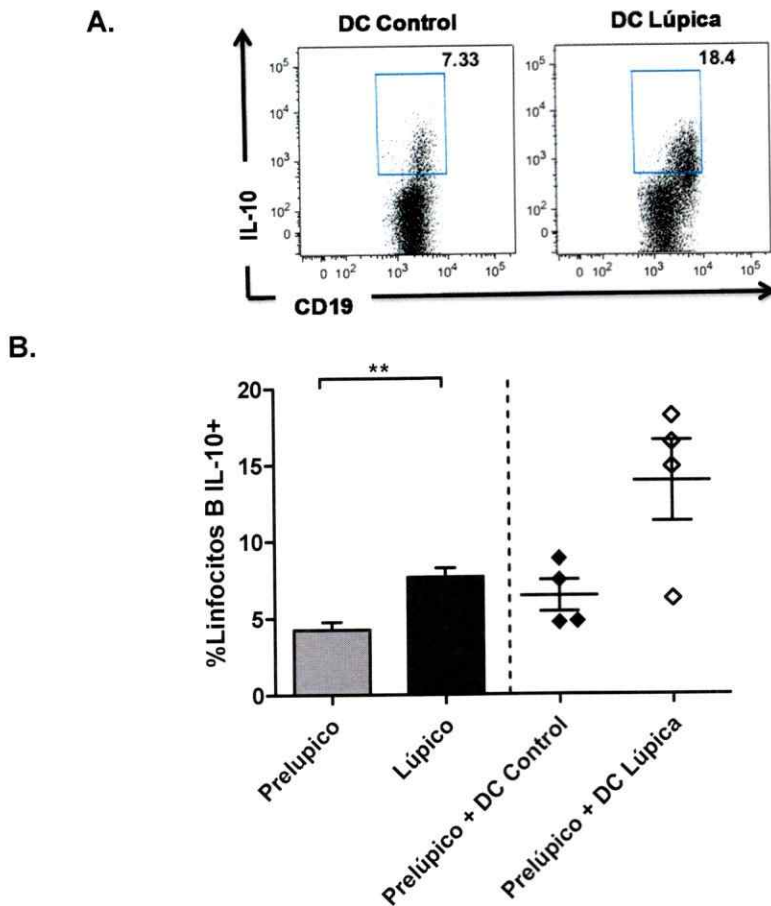


Figura 22. Los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan un aumento de los LB IL-10+ en el bazo. A. Análisis de citometría de flujo de la población de linfocitos B IL-10+ (CD19+CD11c-IL-10+) en el bazo de ratones prelúpicos tratados con DC de ratones control (n=4) o DC de ratones lúpicos (n=4). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Debido a los resultados obtenidos en el timo de los ratones lúpicos, nos pareció pertinente analizar este órgano en los ratones prelúpicos luego de la transferencia adoptiva de DC. Al analizar la expresión de Igs en los LB tímicos se observó el mismo fenómeno observado en bazo, en los timos de los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos existió una disminución de la población de LB vírgenes y un aumento de la población de LB IgM+ (Figura 23)

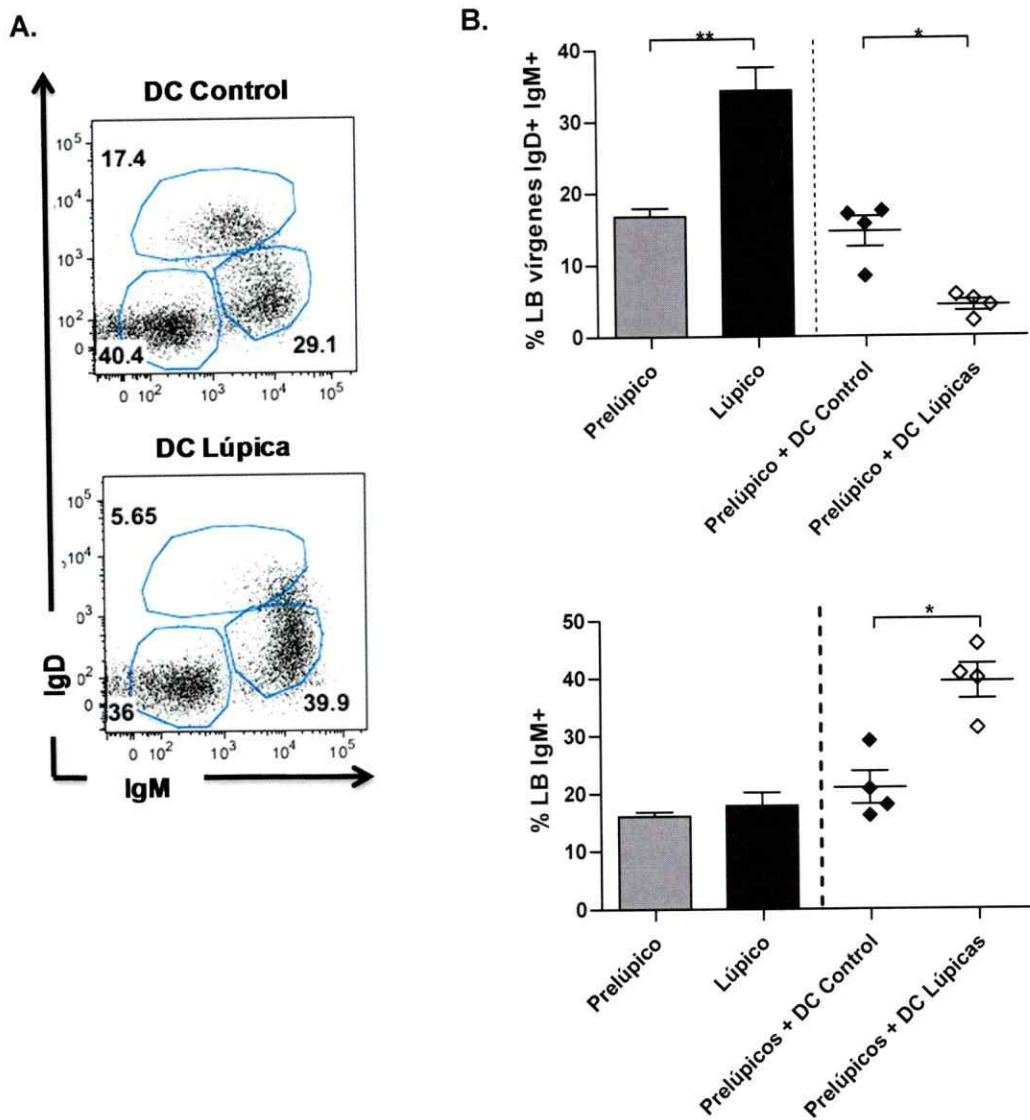


Figura 23. Los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan una disminución de LB vírgenes y un aumento de LB IgM+ en el timo. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de IgD e IgM en la población de LB (CD19+CD11c-) en el timo de ratones prelúpicos tratados con DC de ratones control (n=4) o DC de ratones lúpicos (n=4). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en B. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Al analizar la población de LB CD5+ en el timo se observó un aumento de esta población en el timo de los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos comparado con los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones controles (Figura 24), fenómeno que ya habíamos observado en el bazo (Figura 21) y sangre (datos no mostrados).

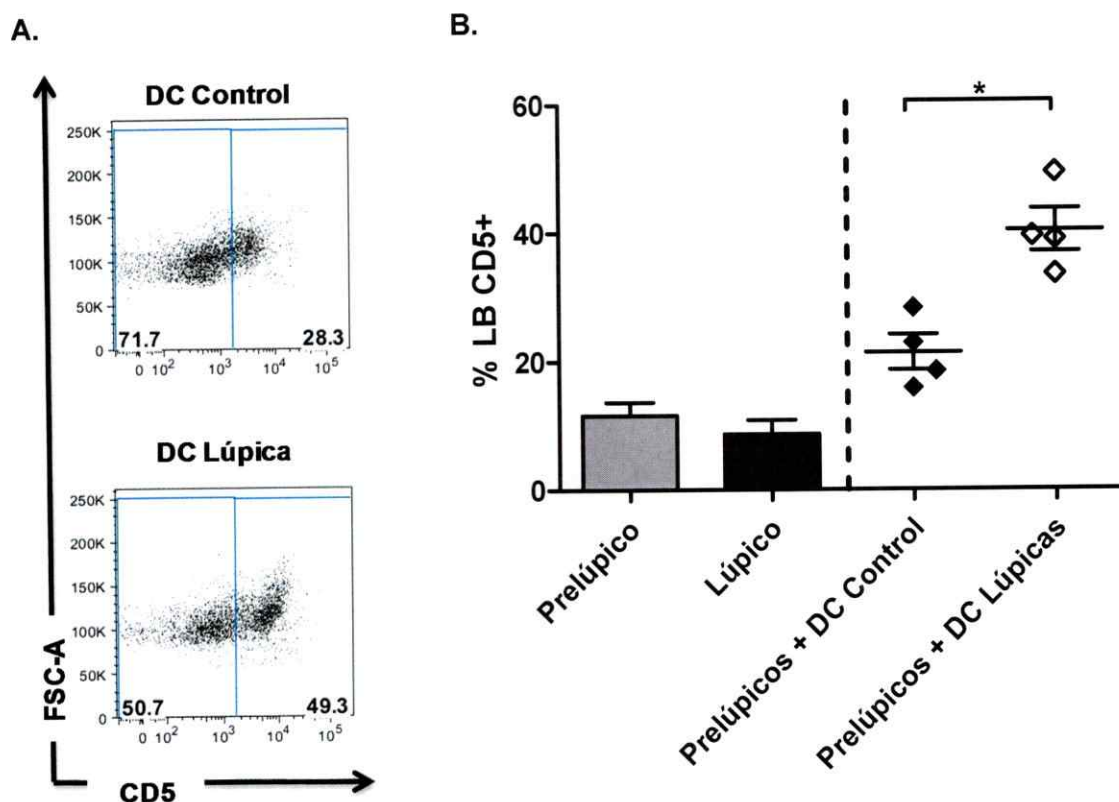


Figura 24. Los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan un aumento de LB CD5+ en el timo. A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD5 en la población de LB (CD19+CD11c-) en el timo de ratones prelúpicos tratados con DC de ratones control (n=4) o DC de ratones lúpicos (n=4). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en **B.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

Además se analizó el porcentaje de células plasmáticas y plasmablastos en timo y bazo de ambos grupos de ratones, para ambos casos se observó la presencia de estas células sin observarse diferencias entre ambos tratamientos (resultados no mostrados).

Finalmente analizamos la expresión de MHC-II en LB de timo, aquellos ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan una disminución en la expresión de MHC-II en los LB comparado a los LB de ratones prelúpicos que recibieron DC de ratones controles (ver Anexos).

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos que los LB de ratones lúpicos presentan una serie de alteraciones en su fenotipo y distribución sub-poblacional durante el desarrollo de la enfermedad.

Inicialmente, se vinculó a los LB con el lupus debido a su capacidad de producir auto-anticuerpos, factor determinante durante el desarrollo del LES. En pacientes con lupus se ha demostrado existe un aumento en la población de LB de memoria CD27+ y de células plasmáticas productoras de anticuerpos (Jacobi y col., 2008). Aunque no se conoce con exactitud la identidad de los LB de memoria en el modelo murino se acepta que los LB de memoria debería al menos expresar los marcadores CD19+GL7-IgD-IgM- (Pape y col., 2011) (Nduati y col., 2010) (Taylor y col., 2012) (Talay y col., 2012). Al analizar la población de LB de memoria en bazo no se observó una diferencia significativa en el porcentaje presente en ratones prelúpicos y lúpicos (Figura 4.B) solo una tendencia al aumento de esta población en el bazo de los ratones lúpicos, el que sí es estadísticamente significativo al analizar los números absolutos. Cabe señalar que la población de LB GL7- es mayoritaria, por lo que en su mayoría la población de LB de bazo IgD-IgM- correspondería a LB de memoria CD19+GL7-IgD-IgM-. Además se observó una tendencia al aumento de la población de LB GL7+ en el bazo de los ratones lúpicos en comparación a ratones prelúpicos, fenómeno que si es estadísticamente significativo al analizar los números absolutos (ver Anexo Fig. Supl. 3). Esto indica un mayor número

de LB presentes en el centro germinal del bazo de estos ratones comparado con los ratones prelúpicos, así como la presencia de células plasmáticas B220-CD138+ en el bazo de los ratones lúpicos (Figura 5.B). Esto concuerda con el aumento en la generación de auto-anticuerpos que existe en estos ratones.

Los LB B-1 son una subpoblación de LB que expresan el marcador CD5 y que residen en las cavidades pleurales y la cavidad peritoneal. En ratones lúpicos se ha descrito esta subpoblación migra de manera anormal hacia otros órganos como el timo, el bazo y otros linfonodos periféricos abandonando la cavidad peritoneal (Ishikawa y Matsushita, 2007). Además se ha sugerido que los LB B-1 en los ratones lúpicos aportarían al desarrollo de autoinmunidad activando LT auto-reactivos en el timo (Ishikawa y Matsushita, 2007) y realizando cambio de isotipo desde IgM hacia IgG produciendo auto anticuerpos (Enghard y col. 2010)

Al analizar la expresión de CD5 en los LB se observó un alto porcentaje de esta población tanto en ratones prelúpicos como lúpicos en el bazo (Figura 6.B). Estudios recientes han demostrado la existencia de dos isoformas de CD5 en LB humanos, donde la presencia de IL-6 regularía la expresión de CD5 en la superficie celular afectando la actividad de los LB. Esta regulación explicaría en parte el mecanismo de los tratamientos anti IL-6 para el LES el que ha resultado bastante efectivo (Graud y col, 2009) (Shirota y col., 2013).

En fenómenos de autoinmunidad se ha descrito el aumento de una subpoblación de LB denominada LB reguladores que se caracterizan por

expresar CD5+CD1dhi y por la producción de IL-10 (Yanaba y col., 2009). Además en el caso de modelos murinos de lupus la depleción de LB genera efectos que indican que los LB tendrían tanto una función patogénica como protectora en el desarrollo del LES, indicando la presencia de distintas subpoblaciones (Haas y col., 2010) (Watanabe y col., 2010). Cuando analizamos los bazo de los distintos grupos de ratones se observó que los LB CD5+ que se observaron en el bazo de los ratones lúpicos también en gran parte expresaron en marcador CD1d fenómeno que no se observó en los LB de ratones prelúpicos (Figura 6.D). Al analizar la producción de IL-10 por parte de los LB se observó que los LB de bazo de ratones lúpicos presentan mayores porcentajes de LB IL-10+ en comparación a ratones prelúpicos (Figura 7.B) fenómeno que en parte podría estar asociado a la edad pues vemos un aumento similar al analizar esta población en el bazo de ratones controles jóvenes y viejos. Además en el caso de los LB de bazo de ratones lúpicos también expresan los marcadores CD1d y CD5 (Figura 9.B) fenotipo asociado a LB reguladores. Estudios en humanos determinaron la existencia de poblaciones de LB reguladores con características similares a las descritas en murinos, es decir LB CD19+CD24hiCD38hi que producen altos niveles de IL-10. Al analizar los LB reguladores en paciente lúpicos se demostró que los LB reguladores producen bajos niveles de IL-10, son refractarios a la activación mediada por CD40 y no suprimen la producción de IFN- γ y TNF- α por LT CD4+ comparado a LB reguladores obtenidos de individuos sanos (Blair y col., 2010). Por tanto es posible que efectivamente el desarrollo del lupus en estos ratones

genere como consecuencia la expansión de la población de LB reguladores, sin embargo esta se ve sobrepasada ya que evidentemente la enfermedad termina por desarrollarse. No se descarta que esta población reguladora posea anomalías en otros mecanismos, aparte de la producción de IL-10 la que observamos si se produce en los ratones lúpicos, necesarios para ejercer su función supresora.

Numerosos estudios en modelos murinos han vinculado el desarrollo del LES con la activación a través de TLR (Desnues y col. 2014) (Teichmann y col., 2013) (Koh y col., 2013) (Hwang y col., 2012) (Lenert y col., 2005) (Ehlers y col., 2006). En particular la activación de LB mediada por ligandos de TLR intracelulares se ha demostrado influye en el desarrollo del LES en modelos murinos mediante la producción de auto-anticuerpos (Teichmann y col. 2013) (Ehlers y col. 2006).

No se observaron diferencias en la expresión de marcadores de activación como CD86 y CD40 (Figura 10), ni en la producción de citoquinas (Figura 11). La similitud observada por LB de ratones lúpicos y de ratones controles podría deberse al diseño experimental utilizado. Resultados obtenidos por el grupo de Alexopoulou, demostraron mediante la utilización de ratones KO para TLR8, TLR9 y el doble KO que solo se observaban diferencias en la producción de IL-6 al estimular con ligandos de TLR cuando realizaban la activación utilizando esplenocitos totales, no así cuando aislaban los LB (Desnues y col. 2014). Esto indicaría que el efecto de los TLR podría no solo

afectar a los LB sino también a otras poblaciones celulares como las DC, y que su interacción causaría un posterior efecto sobre los LB.

Los LB son generados en la médula ósea donde a medida que superan varios checkpoints para eliminar LB auto reactivos salen a la periferia para terminar su maduración en los linfonodos y particularmente el bazo (Jacoby y col., 2009). De manera análoga los LT llevan a cabo un proceso similar en el timo, donde mediante selección positiva y posteriormente negativa se regula la salida de linfocitos T auto reactivos en lo que se denomina tolerancia central (Klein y col., 2009). En este proceso se han involucrado a los LB, que a pesar de ser una población muy minoritaria en el timo parecieran participar de manera activa tanto en la selección negativa de timocitos como en la generación de LT reguladores tímicos (Morlachi y col. 2011) (Frommer y col., 2010) (Guerra y col. 2013)(Walters y col., 2014). La población de LB que existe en el timo es muy pequeña, no supera el 1-2% (Akashi y col., 2000) (Mori y col., 1997) (Ceredig, 2002), por lo que resulta notable el aumento que se observa en los ratones lúpicos donde el porcentaje es hasta cuatro veces mayor al de LB tímicos de los ratones prelúpicos (Figura 12.C). En cuanto a la expresión de CD5 en los LB, a pesar de resultados previos que describen una migración aberrante de los LB B-1 en los ratones lúpicos y su posible homing hacia órganos como el timo (Ishikawa y Matsuchita, 2007), al analizar la expresión de CD5 en los LB tímicos de los distintos grupos de ratones fue posible determinar que solo aproximadamente un 20% de los LB residentes en el timo de ratones lúpicos expresan CD5+ (Ishiwaka y Matsushita, 2007) (Figura 13) descartando que el

aumento de LB observado en el timo de los ratones lúpicos se deba únicamente a la migración de LB CD5+. Un estudio reciente del grupo de Huang determinó que los LB CD5+ existentes en el timo no tendrían relación directa con los LB B-1 provenientes de la cavidad peritoneal (Perera y col., 2013). Por tanto es posible que este aumento de LB observado en el timo de los ratones lúpicos no provenga únicamente de la migración de LB B1, sino también de linfocitos B2, así como de la migración de progenitores desde la médula ósea.

Al analizar la expresión de IgM e IgD en los LB tímicos destaca el aumento de la población de LB IgD-IgM- con respecto a linfocitos B del bazo donde la población de LB IgD-IgM- es mucho menor (Figura 4 y 14). En el caso de los ratones lúpicos, se observó un aumento de los LB vírgenes IgD+IgM+ y una disminución de los LB IgD-IgM- en el timo comparado a los ratones prelúpicos (Figura 14.B). Esto indica que el aumento de los LB tímicos en los ratones lúpicos podría deberse al aumento de la población de LB vírgenes los que podrían estar siendo generados en el timo a partir de progenitores, o podrían provenir de la periferia como resultado de migración anormal de los LB hacia el timo.

Para determinar si este aumento en los LB observado en el timo de los ratones lúpicos se debe a una migración de LB de la periferia y conocer cuál sería su función en el timo, se realizaron co-cultivos de LB tímicos provenientes de un ratón lúpico con timocitos control y se comparó con co-cultivos de LB de bazo de ratones lúpicos con timocitos control. Cabe señalar que el timo de los ratones lúpicos presenta anomalías en cuanto a la distribución de timocitos

CD4+CD8-/CD4-CD8+/CD4+CD8+, en estos timos la población CD4+CD8+ no existe y se observa un aumento en la población de Tregs tímicos (Gleisner y cols, 2013). Al analizar el resultado de los co-cultivos observamos que en todas las condiciones utilizadas la población CD4+CD8+ desaparece por lo que no podemos sacar conclusiones en cuanto a lo que ocurre con los timocitos CD4+CD8+ (Figura 16). Sin embargo, al analizar la población de LT CD4+FoxP3+CD25+, se observó un aumento considerable cuando los timocitos eran co-cultivados en presencia de LB tímicos o de bazo (Figura 17.B). Estos resultados sugieren que por una parte, los LB tímicos si poseen la capacidad de aumentar la población de Tregs tímicos y que esta capacidad sería similar a la que poseen los linfocitos B de bazo.

Estudios previos de nuestro laboratorio así como de otros grupos han demostrado el rol fundamental de las DC en el desarrollo del LES (Gleisner y col., 2013) (Teichmann y col., 2010). Por otra parte, numerosos trabajos han demostrado que la interacción entre las DC y los LB genera cambios en el fenotipo de ambos tipos celulares, producción de citoquinas y la producción de anticuerpos (Ding y col, 2009) (Shaw y col., 2010) (Morva y col., 2012).

Con el objetivo de evaluar el rol de las DC *in vivo*, realizamos experimentos de transferencia adoptiva de DC lúpicas o control en ratones prelúpicos y evaluamos la producción de anticuerpos anti-dsADN y la proteinuria a diferentes tiempos después de la transferencia. Como resultado encontramos que la transferencia de DC lúpicas a ratones prelúpicos acelera la producción de auto-anticuerpos en los ratones prelúpicos (Figura 18), sin

originar cambios en la proteinuria ni en la presencia de células plasmáticas en el bazo (datos no mostrados). En la literatura se ha informado la presencia de células plasmáticas en el riñón de ratones que presentan LES murino (Wang y col., 2014).

Los LB de los ratones prelúpicos tratados con DC de ratones lúpicos, presentaron mayores niveles de activación determinado por una mayor expresión de PD-L1, PD-L2 y CD86 y una disminución en la expresión de MHC-II comparado a los LB de los ratones prelúpicos que recibieron DC de ratones controles (Figura 19).

Por otra parte, se observó un fuerte incremento en los LB IgM+ en bazo y timo de los ratones prelúpicos transferidos con DC de ratones lúpicos (Figura 20 y 23), así como un incremento en la población de LB CD5+ en el timo y en el bazo (Figura 21 y 24). Finalmente se observó un aumento de LB reguladores CD1dhiCD5 y de LB productores de IL-10 en el bazo de los ratones prelúpicos inyectados con DC de ratones lúpicos (Figura 21 y 22).

En definitiva, los resultados obtenidos a partir de la transferencia adoptiva de DC de ratones lúpicos o control a ratones prelúpicos demuestran que las DC de los ratones lúpicos poseen características funcionales y fenotípicas, como un mayor estado de activación y patrones de migración anormal, que tienen un efecto sobre los LB, ya sea de manera directa o indirecta, causando su activación y provocando una respuesta humoral exacerbada durante el desarrollo del LES.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo demostramos que los LB de ratones lúpicos presentan alteraciones en su fenotipo en el bazo y el timo, lo que puede estar fuertemente vinculado al desarrollo de lupus.

Los LB tímicos de los ratones lúpicos se encuentran significativamente aumentados, observándose fuertes diferencias en su fenotipo lo que podría afectar su rol tanto en la selección negativa como en la generación de LT reguladores, por tanto afectando el establecimiento de tolerancia central y por consiguiente aportando al desarrollo de lupus.

Las DC de ratones lúpicos generan algunos de los cambios observados en el fenotipo de los LB de los ratones lúpicos contribuyendo así al estado de hiperactividad de los LB y al desarrollo de una respuesta humoral exacerbada aportando así al desarrollo del LES.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] E. M. Akirav, Y. Xu, and N. H. Ruddle, "Resident B cells regulate thymic expression of myelin oligodendrocyte glycoprotein.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 235, no. 1–2, pp. 33–9, Jun. 2011.
- [2] H.-J. Anders, D. Zecher, R. D. Pawar, and P. S. Patole, "Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 7, no. 5, pp. 215–24, Jan. 2005.
- [3] M. R. Arbuckle, M. T. McClain, M. V Rubertone, R. H. Scofield, G. J. Dennis, J. a James, and J. B. Harley, "Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 16, pp. 1526–33, Oct. 2003.
- [4] A. M. Avalos and H. L. Ploegh, "Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells.," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. March, p. 92, Jan. 2014.
- [5] J. Banachereau and F. Briere, "Immunobiology of dendritic cells," *Annu. Rev. ...*, no. Figure 1, pp. 767–811, 2000.
- [6] F. D. Batista and N. E. Harwood, "The who, how and where of antigen presentation to B cells.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 15–27, Jan. 2009.
- [7] N. Baumgarth, "The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 34–46, Jan. 2011.
- [8] O. Berggren, N. Hagberg, G. Weber, G. V Alm, L. Rönnblom, and M.-L. Eloranta, "B lymphocytes enhance interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells.," *Arthritis Rheum.*, vol. 64, no. 10, pp. 3409–19, Oct. 2012.
- [9] P. a Blair, L. Y. Noreña, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. a Isenberg, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri, "CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients.," *Immunity*, vol. 32, no. 1, pp. 129–40, Jan. 2010.
- [10] M. Bonelli, a. Savitskaya, C.-W. Steiner, E. Rath, J. S. Smolen, and C. Scheinecker, "Phenotypic and Functional Analysis of CD4+CD25-Foxp3+ T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 3, pp. 1689–1695, Jan. 2009.

- [11] J. Booth, H. Wilson, S. Jimbo, and G. Mutwiri, "Modulation of B cell responses by Toll-like receptors.," *Cell Tissue Res.*, vol. 343, no. 1, pp. 131–40, Jan. 2011.
- [12] R. Brummel and P. Lenert, "Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A (D) CpG-oligodeoxynucleotides," *J. Immunol.*, no. D, 2005.
- [13] P. Casali, S. E. Burastero, J. E. Balow, and a L. Notkins, "High-affinity antibodies to ssDNA are produced by CD-B cells in systemic lupus erythematosus patients.," *J. Immunol.*, vol. 143, no. 11, pp. 3476–83, Dec. 1989.
- [14] G. Cassese, S. Lindenau, B. de Boer, S. Arce, a Hauser, G. Riemekasten, C. Berek, F. Hiepe, V. Krenn, a Radbruch, and R. a Manz, "Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, no. 9, pp. 2726–32, Sep. 2001.
- [15] R. Ceredig, "The ontogeny of B cells in the thymus of normal, CD3 epsilon knockout (KO), RAG-2 KO and IL-7 transgenic mice.," *Int. Immunol.*, vol. 14, no. 1, pp. 87–99, Jan. 2002.
- [16] O. T. Chan, L. G. Hannum, a M. Haberman, M. P. Madaio, and M. J. Shlomchik, "A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus.," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 10, pp. 1639–48, May 1999.
- [17] S. Corinti, C. Albanesi, a la Sala, S. Pastore, and G. Girolomoni, "Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Functions," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 7, pp. 4312–4318, Apr. 2001.
- [18] P. Cufi, N. Dragin, N. Ruhlmann, J. M. Weiss, E. Fadel, A. Serraf, S. Berrih-Aknin, and R. Le Panse, "Central role of interferon-beta in thymic events leading to myasthenia gravis.," *J. Autoimmun.*, pp. 1–9, Jan. 2014.
- [19] G.-M. Deng and G. C. Tsokos, "Cholera Toxin B Accelerates Disease Progression in Lupus-Prone Mice by Promoting Lipid Raft Aggregation," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 6, pp. 4019–4026, Sep. 2008.
- [20] B. Desnues, A. B. Macedo, A. Roussel-Queval, J. Bonnardel, S. Henri, O. Demaria, and L. Alexopoulou, "TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 4, pp. 1497–502, Jan. 2014.

- [21] J. Diana, Y. Simoni, L. Furio, L. Beaudoin, B. Agerberth, F. Barrat, and A. Lehuen, "Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes.," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 65–73, Jan. 2013.
- [22] C. Ding, Y. Cai, J. Marroquin, S. T. Ildstad, and J. Yan, "Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner.," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 11, pp. 7140–9, Dec. 2009.
- [23] I. Dogan, B. Bertocci, V. Vilmon, F. Delbos, J. Mégret, S. Storck, C.-A. Reynaud, and J.-C. Weill, "Multiple layers of B cell memory with different effector functions.," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 12, pp. 1292–9, Dec. 2009.
- [24] T. Dörner, A. M. Jacobi, J. Lee, and P. E. Lipsky, "Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus.," *J. Immunol. Methods*, vol. 363, no. 2, pp. 187–97, Jan. 2011.
- [25] F. J. Dumont, R. Barrois, and E. B. Jacobson, "Migration of peripheral T and B cells into the thymus of aging (NZB X SJL)F1 female mice.," *Cell. Immunol.*, vol. 83, no. 2, pp. 292–301, Feb. 1984.
- [26] M. Ehlers, H. Fukuyama, T. L. McGaha, A. Aderem, and J. V Ravetch, "TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE.," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 3, pp. 553–61, Mar. 2006.
- [27] P. Enghard, J. Y. Humrich, V. T. Chu, E. Grussie, F. Hiepe, G.-R. Burmester, A. Radbruch, C. Berek, and G. Riemekasten, "Class switching and consecutive loss of dsDNA-reactive B1a B cells from the peritoneal cavity during murine lupus development.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1809–18, Jun. 2010.
- [28] M. C. Fariñas, B. Adkins, a M. Stall, I. Weissman, and S. Strober, "B cell infiltration of the thymic medulla in New Zealand black, New Zealand white, and (New Zealand black x New Zealand white)F1 mice. Effect of total lymphoid irradiation.," *Arthritis Rheum.*, vol. 33, no. 5, pp. 702–10, May 1990.
- [29] B. J. Fayette, B. Dubois, S. Vandenabeele, J. Bridon, B. Vanbervliet, I. Durand, J. Banchemereau, C. Caux, and F. Brière, "Human Dendritic Cells Skew Isotype Switching of," vol. 185, no. 11, 1997.
- [30] I. Ferrero and F. Anjuère, "Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection," *Eur. J. ...*, pp. 1598–1609, 1999.
- [31] F. Flores-Borja, A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. a Isenberg, and C. Mauri, "CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting

TH1 and TH17 differentiation.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 173, p. 173ra23, Feb. 2013.

[32] F. Frommer and A. Waisman, "B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells.," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, p. e15372, Jan. 2010.

[33] K. Fujio, T. Okamura, S. Sumitomo, and K. Yamamoto, "Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 72 Suppl 2, pp. ii85–9, Apr. 2013.

[34] S. Garaud, C. Le Dantec, S. Jousse-Joulin, C. Hanrotel-Saliou, A. Saraux, R. a Mageed, P. Youinou, and Y. Renaudineau, "IL-6 modulates CD5 expression in B cells from patients with lupus by regulating DNA methylation.," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 9, pp. 5623–32, May 2009.

[35] M. A. Gleisner, P. Reyes, J. Alfaro, P. Solanes, V. Simon, N. Crisostomo, D. Sauma, M. Roseblatt, and M. R. Bono, "Dendritic and stromal cells from the spleen of lupic mice present phenotypic and functional abnormalities.," *Mol. Immunol.*, vol. 54, no. 3–4, pp. 423–434, Feb. 2013.

[36] a Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, a S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin, "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.," *Science*, vol. 285, no. 5425, pp. 221–7, Jul. 1999.

[37] D. O. Griffin and T. L. Rothstein, "A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus.," *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 13, pp. 2591–8, Dec. 2011.

[38] L. Guerri, I. Peguillet, Y. Geraldo, S. Nabti, V. Premel, and O. Lantz, "Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 5, pp. 2102–10, Mar. 2013.

[39] K. M. Haas, R. Watanabe, T. Matsushita, H. Nakashima, N. Ishiura, H. Okochi, M. Fujimoto, and T. F. Tedder, "Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice.," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 9, pp. 4789–800, May 2010.

[40] H. Hadeiba, K. Lahl, A. Edalati, C. Oderup, A. Habtezion, R. Pachynski, L. Nguyen, A. Ghodsi, S. Adler, and E. C. Butcher, "Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance.," *Immunity*, vol. 36, no. 3, pp. 438–50, Mar. 2012.

- [41] Y. Harada, M. M. Kawano, N. Huang, M. S. Mahmoud, I. a Lisukov, K. Mihara, T. Tsujimoto, and a Kuramoto, "Identification of early plasma cells in peripheral blood and their clinical significance.," *Br. J. Haematol.*, vol. 92, no. 1, pp. 184–91, Jan. 1996.
- [42] K. Hayakawa and R. Hardy, "The ' Ly-1 B' cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice.," *J. ...*, vol. 157, no. January, 1983.
- [43] D. L. Hodge, D. Reynolds, F. M. Cerbán, S. G. Correa, N. S. Baez, H. a Young, and M. C. Rodriguez-Galan, "MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, no. 10, pp. 2644–54, Oct. 2012.
- [44] M. Horikawa, E. T. Weimer, D. J. DiLillo, G. M. Venturi, R. Spolski, W. J. Leonard, M. T. Heise, and T. F. Tedder, "Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during *Listeria* infection governs innate and cellular immune responses in mice.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 3, pp. 1158–68, Feb. 2013.
- [45] S.-H. Hwang, H. Lee, M. Yamamoto, L. a Jones, J. Dayalan, R. Hopkins, X. J. Zhou, F. Yarovinsky, J. E. Connolly, M. a Curotto de Lafaille, E. K. Wakeland, and A.-M. Fairhurst, "B cell TLR7 expression drives anti-RNA autoantibody production and exacerbates disease in systemic lupus erythematosus-prone mice.," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 12, pp. 5786–96, Dec. 2012.
- [46] B. S. Ishikawa, T. Sato, M. Abe, S. Nagai, N. Onai, H. Yoneyama, Y. Zhang, T. Suzuki, S. Hashimoto, T. Shirai, M. Lipp, and K. Matsushima, "Aberrant High Expression of B Lymphocyte Chemokine (BLC / CXCL13) by C11b \geq CD11c \geq Dendritic Cells in Murine Lupus and Preferential Chemotaxis of B1 Cells Towards BLC," vol. 193, no. 12, pp. 1393–1402, 2001.
- [47] A. M. Jacobi, M. Odendahl, K. Reiter, A. Bruns, G. R. Burmester, A. Radbruch, G. Valet, P. E. Lipsky, and T. Dörner, "Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.," *Arthritis Rheum.*, vol. 48, no. 5, pp. 1332–42, May 2003.
- [48] A. M. Jacobi, K. Reiter, M. Mackay, C. Aranow, F. Hiepe, A. Radbruch, A. Hansen, G.-R. Burmester, B. Diamond, P. E. Lipsky, and T. Dörner, "Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95.," *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 6, pp. 1762–73, Jun. 2008.

- [49] A. M. Jacobi, J. Zhang, M. Mackay, C. Aranow, and B. Diamond, "Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus.," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e5776, Jan. 2009.
- [50] C. a Janeway, "How the immune system works to protect the host from infection: a personal view.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 13, pp. 7461–8, Jun. 2001.
- [51] G. Jego, A. K. Palucka, J. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, and J. Banchereau, "Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6," vol. 19, pp. 225–234, 2003.
- [52] J. Jellusova and L. Nitschke, "Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors siglec-G and CD22.," *Front. Immunol.*, vol. 2, no. January, p. 96, Jan. 2011.
- [53] T. N. Jørgensen, J. Alfaro, H. L. Enriquez, C. Jiang, W. M. Loo, S. Atencio, M. R. G. Bupp, C. M. Mailloux, T. Metzger, S. Flannery, S. J. Rozzo, B. L. Kotzin, M. Roseblatt, M. R. Bono, and L. D. Erickson, "Development of murine lupus involves the combined genetic contribution of the SLAM and FcgammaR intervals within the Nba2 autoimmune susceptibility locus.," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 2, pp. 775–86, Jan. 2010.
- [54] S.-M. Ka, C.-W. Cheng, H.-A. Shui, W.-M. Wu, D.-M. Chang, Y.-C. Lin, and A. Chen, "Mesangial cells of lupus-prone mice are sensitive to chemokine production.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, no. 4, p. R67, Jan. 2007.
- [55] L. Klein, M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski, "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 833–44, Dec. 2009.
- [56] M. W. Klinker and S. K. Lundy, "Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes.," *Mol. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 123–37, Jan. 2012.
- [57] Y. T. Koh, J. C. Scatizzi, J. D. Gahan, B. R. Lawson, R. Baccala, K. M. Pollard, B. a Beutler, A. N. Theofilopoulos, and D. H. Kono, "Role of nucleic acid-sensing TLRs in diverse autoantibody specificities and anti-nuclear antibody-producing B cells.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 10, pp. 4982–90, May 2013.
- [58] S. Lacotte, M. Decossas, C. Le Coz, S. Brun, S. Muller, and H. Dumortier, "Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice.," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e58140, Jan. 2013.

- [59] R. Lande and D. Ganguly, "Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus," *Sci. Transl.* ..., vol. 3, no. 73, pp. 1–20, 2011.
- [60] F. E. Lovegrove, L. Peña-Castillo, W. C. Liles, T. R. Hughes, and K. C. Kain, "Plasmodium falciparum shows transcriptional versatility within the human host.," *Trends Parasitol.*, vol. 24, no. 7, pp. 288–91, Jul. 2008.
- [61] P. L. Lugar, C. Love, A. C. Grammer, S. S. Dave, and P. E. Lipsky, "Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus.," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, p. e44362, Jan. 2012.
- [62] F. E. Lund, "Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 20, no. 3, pp. 332–8, Jun. 2008.
- [63] F. E. Lund and T. D. Randall, "Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 4, pp. 236–47, Apr. 2010.
- [64] B. Margry, S. C. W. Kersemakers, A. Hoek, G. J. a Arkesteijn, W. H. Wieland, W. van Eden, and F. Broere, "Activated peritoneal cavity B-1a cells possess regulatory B cell properties.," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e88869, Jan. 2014.
- [65] S. D. Marks and K. Tullus, "Autoantibodies in systemic lupus erythematosus.," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 27, no. 10, pp. 1855–68, Oct. 2012.
- [66] D. Maseda, K. M. Candando, S. H. Smith, I. Kalampokis, C. T. Weaver, S. E. Plevy, J. C. Poe, and T. F. Tedder, "Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN- γ +CD4+ T cell numbers during colitis development in mice.," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 5, pp. 2780–95, Sep. 2013.
- [67] K. Matsushima and Y. Ishikawa, "Aberrant B1 cell trafficking in lupus," *Front. Biosci.*, vol. 12, pp. 1790–1803, 2007.
- [68] J. Menke, J. a. Lucas, G. C. Zeller, M. E. Keir, X. R. Huang, N. Tsuboi, T. N. Mayadas, H. Y. Lan, a. H. Sharpe, and V. R. Kelley, "Programmed Death 1 Ligand (PD-L) 1 and PD-L2 Limit Autoimmune Kidney Disease: Distinct Roles," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 11, pp. 7466–7477, Nov. 2007.
- [69] Z. Mitrovic, J. Iqbal, K. Fu, L. M. Smith, M. Bast, T. C. Greiner, P. Aoun, J. O. Armitage, J. M. Vose, D. D. Weisenburger, and W. C. Chan, "CD43 expression is associated with inferior survival in the non-germinal centre B-cell subgroup of diffuse large B-cell lymphoma.," *Br. J. Haematol.*, vol. 162, no. 1, pp. 87–92, Jul. 2013.

- [70] M. Miyama-Inaba and S. Kuma, "Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice.," *J. Exp. Med.*, vol. 168, no. August, pp. 1–6, 1988.
- [71] C. Mohan, L. Morel, P. Yang, and E. K. Wakeland, "Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice.," *Arthritis Rheum.*, vol. 41, no. 9, pp. 1652–62, Sep. 1998.
- [72] S. Mori, M. Inaba, and A. Sugihara, "Presence of B cell progenitors in the thymus.," *J. ...*, 1997.
- [73] S. Morlacchi, C. Soldani, A. Viola, and A. Sarukhan, "Self-antigen presentation by mouse B cells results in regulatory T-cell induction rather than anergy or clonal deletion.," *Blood*, vol. 118, no. 4, pp. 984–91, Jun. 2011.
- [74] A. Morva, S. Lemoine, A. Achour, J.-O. Pers, P. Youinou, and C. Jamin, "Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes.," *Blood*, vol. 119, no. 1, pp. 106–14, Jan. 2012.
- [75] V. Moulin, F. Andris, K. Thielemans, C. Maliszewski, J. Urbain, and M. Moser, "B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation.," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 4, pp. 475–82, Aug. 2000.
- [76] I. M. Mumtaz, B. F. Hoyer, D. Panne, K. Moser, O. Winter, Q. Y. Cheng, T. Yoshida, G.-R. Burmester, A. Radbruch, R. a Manz, and F. Hiepe, "Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: implications for the treatment of autoimmunity.," *J. Autoimmun.*, vol. 39, no. 3, pp. 180–8, Sep. 2012.
- [77] E. W. Nduati, D. H. L. Ng, F. M. Ndungu, P. Gardner, B. C. Urban, and J. Langhorne, "Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice.," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, p. e15007, Jan. 2010.
- [78] M. Odendahl, a. Jacobi, a. Hansen, E. Feist, F. Hiepe, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, a. Radbruch, and T. Dorner, "Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 10, pp. 5970–5979, Nov. 2000.
- [79] M. Odendahl, a Jacobi, a Hansen, E. Feist, F. Hiepe, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, a Radbruch, and T. Dörner, "Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus.," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 10, pp. 5970–9, Nov. 2000.

- [80] K. Ohl and K. Tenbrock, "Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 432595, Jan. 2011.
- [81] C. Ohnmacht, A. Pullner, S. B. S. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, and D. Voehringer, "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 3, pp. 549–59, Mar. 2009.
- [82] K. a Pape, J. J. Taylor, R. W. Maul, P. J. Gearhart, and M. K. Jenkins, "Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response.," *Science*, vol. 331, no. 6021, pp. 1203–7, Mar. 2011.
- [83] M. Parcina, M. A. Miranda-Garcia, S. Durlanik, S. Ziegler, B. Over, P. Georg, S. Foermer, S. Ammann, D. Hilmi, K.-J. Weber, M. Schiller, K. Heeg, W. Schneider-Brachert, F. Götz, and I. Bekeredjian-Ding, "Pathogen-triggered activation of plasmacytoid dendritic cells induces IL-10-producing B cells in response to *Staphylococcus aureus*.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 4, pp. 1591–602, Feb. 2013.
- [84] J. Perera, L. Meng, F. Meng, and H. Huang, "Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 42, pp. 17011–6, Oct. 2013.
- [85] D. Perry, A. Sang, Y. Yin, Y.-Y. Zheng, and L. Morel, "Murine models of systemic lupus erythematosus.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 271694, Jan. 2011.
- [86] H. Poeck, M. Wagner, J. Battiany, S. Rothenfusser, D. Wellisch, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann, "Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help.," *Blood*, vol. 103, no. 8, pp. 3058–64, Apr. 2004.
- [87] D. J. Rawlings, M. a Schwartz, S. W. Jackson, and A. Meyer-Bahlburg, "Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 282–94, Apr. 2012.
- [88] B. Reizis, A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, and V. Sisirak, "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 163–83, Jan. 2011.

- [89] C.-A. Reynaud, M. Descatoire, I. Dogan, F. Huetz, S. Weller, and J.-C. Weill, "IgM memory B cells: a mouse/human paradox.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, no. 10, pp. 1625–34, May 2012.
- [90] A. Sadanaga, H. Nakashima, M. Akahoshi, K. Masutani, K. Miyake, T. Igawa, N. Sugiyama, H. Niino, and M. Harada, "Protection against autoimmune nephritis in MyD88-deficient MRL/lpr mice.," *Arthritis Rheum.*, vol. 56, no. 5, pp. 1618–28, May 2007.
- [91] A. Sang, Y.-Y. Zheng, and L. Morel, "Contributions of B cells to lupus pathogenesis.," *Mol. Immunol.*, pp. 1–10, Dec. 2013.
- [92] M. Seifert and R. Küppers, "Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 12, pp. 2659–69, Nov. 2009.
- [93] J. Shaw, Y.-H. Wang, T. Ito, K. Arima, and Y.-J. Liu, "Plasmacytoid dendritic cells regulate B-cell growth and differentiation via CD70.," *Blood*, vol. 115, no. 15, pp. 3051–7, Apr. 2010.
- [94] Y. Shirota, C. Yarboro, R. Fischer, T.-H. Pham, P. Lipsky, and G. G. Illei, "Impact of anti-interleukin-6 receptor blockade on circulating T and B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 72, no. 1, pp. 118–28, Jan. 2013.
- [95] M. Shlomchik and M. Madaio, "The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity.," *J. ...*, vol. 180, no. October, 1994.
- [96] K. L. Silver, T. L. Crockford, T. Bouriez-Jones, S. Milling, T. Lambe, and R. J. Cornall, "MyD88-dependent autoimmune disease in Lyn-deficient mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 10, pp. 2734–43, Oct. 2007.
- [97] C. Starke, S. Frey, U. Wellmann, V. Urbonaviciute, M. Herrmann, K. Amann, G. Schett, T. Winkler, and R. E. Voll, "High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 7, pp. 2107–12, Jul. 2011.
- [98] B. Steiniger, E. M. Timphus, and P. J. Barth, "The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants.," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 126, no. 6, pp. 641–8, Dec. 2006.
- [99] R. M. Steinman and J. Idoyaga, "Features of the dendritic cell lineage.," *Immunol. Rev.*, vol. 234, no. 1, pp. 5–17, Mar. 2010.

- [100] D. Strachan, "Hay fever, hygiene, and household size.," *BMJ Br. Med. J.*, vol. 299, no. November, pp. 1259–1260, 1989.
- [101] O. Talay, D. Yan, H. D. Brightbill, E. E. M. Straney, M. Zhou, E. Ladi, W. P. Lee, J. G. Egen, C. D. Austin, M. Xu, and L. C. Wu, "IgE⁺ memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway.," *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 396–404, Apr. 2012.
- [102] J. J. Taylor, K. a Pape, and M. K. Jenkins, "A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response.," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 3, pp. 597–606, Mar. 2012.
- [103] L. L. Teichmann, D. Schenten, R. Medzhitov, M. Kashgarian, and M. J. Shlomchik, "Signals via the Adaptor MyD88 in B Cells and DCs Make Distinct and Synergistic Contributions to Immune Activation and Tissue Damage in Lupus," *Immunity*, vol. 37, pp. 1–13, Mar. 2013.
- [104] S. Tracy, K. M. Drescher, N. M. Chapman, K. Kim, S. Pirruccello, P. H. Lane, J. R. Romero, S. D. Carson, and J. S. Leser, "Toward Testing the Hypothesis that Group B Coxsackieviruses (CVB) Trigger Insulin-Dependent Diabetes : Inoculating Nonobese Diabetic Mice with CVB Markedly Lowers Diabetes Incidence Toward Testing the Hypothesis that Group B Coxsackieviruses (CVB) Tri," *J. vi*, vol. 76, no. 23, pp. 12097–12111, 2002.
- [105] G. C. Tsokos, "Systemic Lupus Erythematosus," *new*, vol. 365, pp. 2110–2121, 2011.
- [106] S. N. Walters, K. E. Webster, S. Daley, and S. T. Grey, "A Role for Intrathymic B Cells in the Generation of Natural Regulatory T Cells.," *J. Immunol.*, May 2014.
- [107] W. Wang, J. Rangel-Moreno, T. Owen, J. Barnard, S. Nevarez, H. T. Ichikawa, and J. H. Anolik, "Long-term B cell depletion in murine lupus eliminates autoantibody-secreting cells and is associated with alterations in the kidney plasma cell niche.," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 7, pp. 3011–20, Apr. 2014.
- [108] R. Watanabe, N. Ishiura, H. Nakashima, Y. Kuwano, H. Okochi, K. Tamaki, S. Sato, T. F. Tedder, and M. Fujimoto, "Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity.," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 9, pp. 4801–9, May 2010.
- [109] J. M. Weiss, P. Cufi, J. Bismuth, B. Eymard, E. Fadel, S. Berrih-Aknin, and R. Le Panse, "SDF-1/CXCL12 recruits B cells and antigen-presenting cells to the thymus of

autoimmune myasthenia gravis patients.," *Immunobiology*, vol. 218, no. 3, pp. 373–81, Mar. 2013.

[110] J. E. Wither, V. Roy, and L. a Brennan, "Activated B cells express increased levels of costimulatory molecules in young autoimmune NZB and (NZB x NZW)F(1) mice.," *Clin. Immunol.*, vol. 94, no. 1, pp. 51–63, Jan. 2000.

[111] M. Wykes, a Pombo, C. Jenkins, and G. G. MacPherson, "Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response.," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 3, pp. 1313–9, Aug. 1998.

[112] Z. Xu, E. J. Butfiloski, E. S. Sobel, and L. Morel, "Mechanisms of Peritoneal B-1a Cells Accumulation Induced by Murine Lupus Susceptibility Locus Sle2," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 10, pp. 6050–6058, Nov. 2004.

[113] K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto, and T. F. Tedder, "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses.," *Immunity*, vol. 28, no. 5, pp. 639–50, May 2008.

[114] K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T. F. Tedder, "The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals.," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 12, pp. 7459–72, Jun. 2009.

[115] K. Yanaba, A. Yoshizaki, Y. Asano, T. Kadono, T. F. Tedder, and S. Sato, "IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model.," *Am. J. Pathol.*, vol. 178, no. 2, pp. 735–43, Feb. 2011.

[116] M. Yang, J. Deng, Y. Liu, K.-H. Ko, X. Wang, Z. Jiao, S. Wang, Z. Hua, L. Sun, G. Srivastava, C.-S. Lau, X. Cao, and L. Lu, "IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation.," *Am. J. Pathol.*, vol. 180, no. 6, pp. 2375–85, Jun. 2012.

[117] X. Yang, J. Yang, Y. Chu, Y. Xue, D. Xuan, S. Zheng, and H. Zou, "T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus.," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. e88441, Jan. 2014.

[118] A. Yoshizaki, T. Miyagaki, D. J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, E. I. Kountikov, R. Spolski, J. C. Poe, W. J. Leonard, and T. F. Tedder, "Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions.," *Nature*, vol. 491, no. 7423, pp. 264–8, Nov. 2012.

- [119] P. Zaccane, Z. Fehérvári, F. M. Jones, S. Sidobre, M. Kronenberg, D. W. Dunne, and A. Cooke, "Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1439–49, May 2003.
- [120] G. Zandman-Goddard, Y. Berkun, O. Barzilai, M. Boaz, M. Ram, J. M. Anaya, and Y. Shoenfeld, "Neuropsychiatric lupus and infectious triggers.," *Lupus*, vol. 17, no. 5, pp. 380–4, May 2008.
- [121] G. Zandman-Goddard, Y. Berkun, O. Barzilai, M. Boaz, M. Blank, M. Ram, Y. Sherer, J. M. Anaya, and Y. Shoenfeld, "Exposure to Epstein-Barr virus infection is associated with mild systemic lupus erythematosus disease.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1173, pp. 658–63, Sep. 2009.
- [122] D. Zeng, M.-K. Lee, J. Tung, a. Brendolan, and S. Strober, "Cutting Edge: A Role for CD1 in the Pathogenesis of Lupus in NZB/NZW Mice," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 10, pp. 5000–5004, May 2000.
- [123] X. Zhong, S. Lau, C. Bai, N. Degauque, N. E. Holodick, S. J. Steven, J. Tumang, W. Gao, and T. L. Rothstein, "A novel subpopulation of B-1 cells is enriched with autoreactivity in normal and lupus-prone mice.," *Arthritis Rheum.*, vol. 60, no. 12, pp. 3734–43, Dec. 2009.
- [124] N. S. Zuckerman, W. a Howard, J. Bismuth, K. Gibson, H. Edelman, S. Berrih-Aknin, D. Dunn-Walters, and R. Mehr, "Ectopic GC in the thymus of myasthenia gravis patients show characteristics of normal GC.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 4, pp. 1150–61, Apr. 2010.

8. ANEXOS

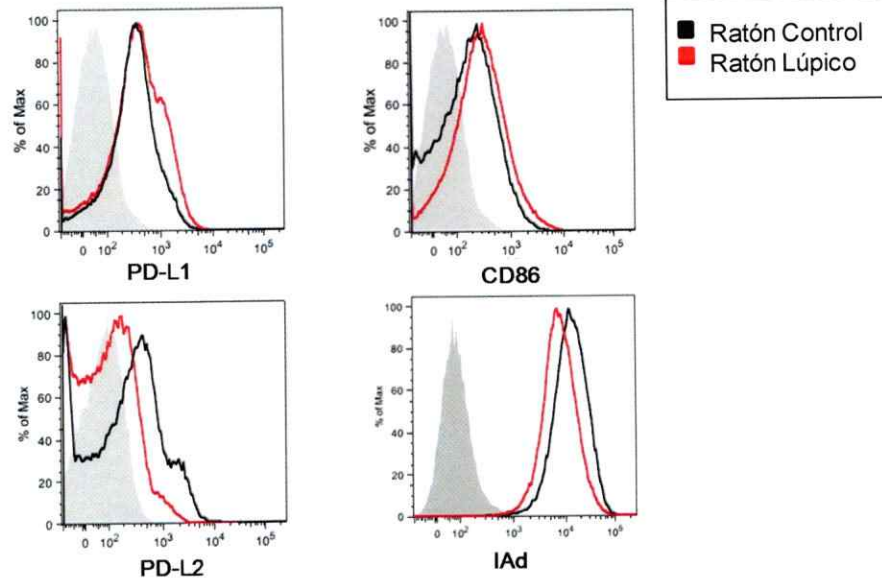


Figura Suplementaria 1. Expresión de PD-L1, CD86, PD-L2 y MHC-II en LB de bazo de ratones lúpicos. Superposición de histogramas de fluorescencia de la expresión de PD-L1, PD-L2, CD86 e IAd en LB totales (CD19⁺ CD11c⁻) de bazo de ratones controles Balb/c viejos y Lúpicos.

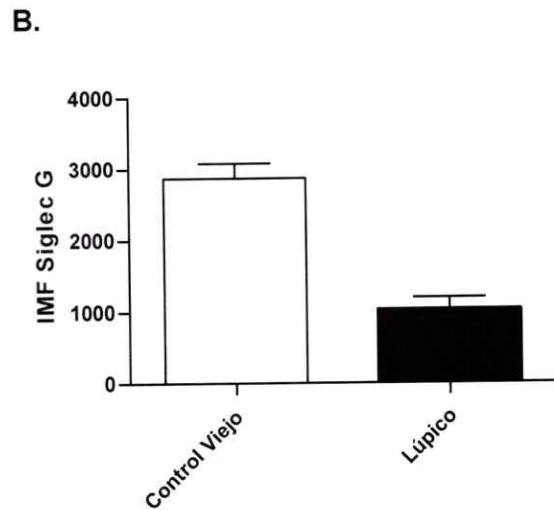
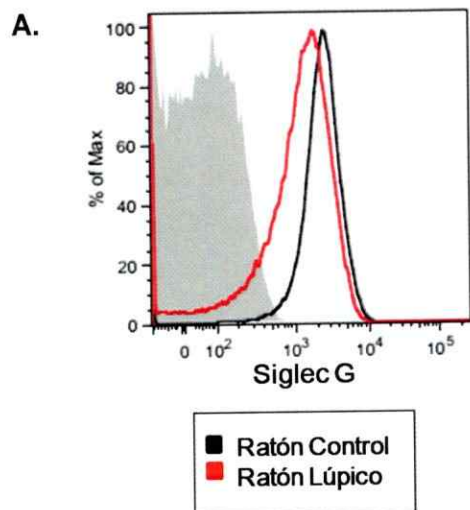


Figura suplementaria 2. Linfocitos B de bazo de ratones lúpicos expresan Siglec-G. **A.** Superposición de histogramas de fluorescencia para la expresión de Siglec-G en LB totales (CD19⁺ CD11c⁻) de bazo de ratones control NZW/Balb/c (n=5) y Lúpicos (n=8). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A.

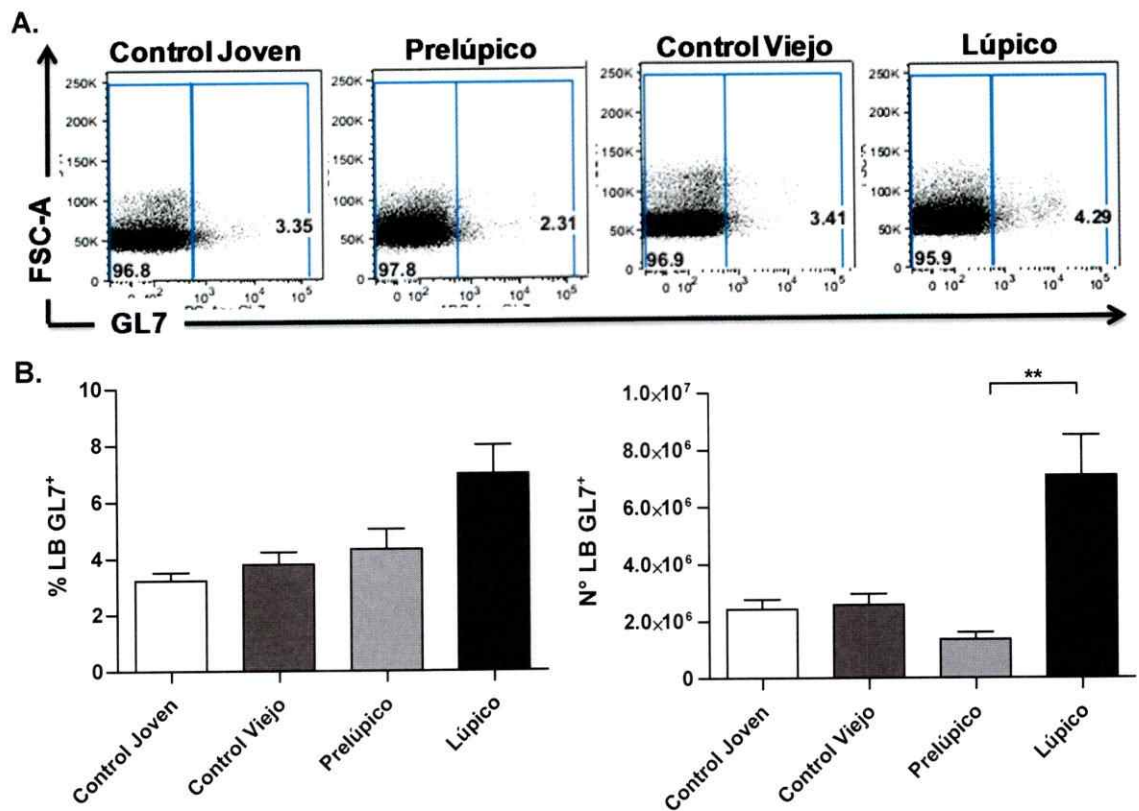


Figura suplementaria 3. Expresión de GL7 en LB de bazo de ratones lúpico. **A.** Análisis de Citometría de flujo de la expresión de GL7 en la población de LB (CD19+CD11c-) de bazo de ratones controles jóvenes Balb/c (n=4), prelúpico (n=6), controles viejos Balb/c (n=9) y lúpico (n=13). **B.** Cuantificación de los resultados obtenidos en **A.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

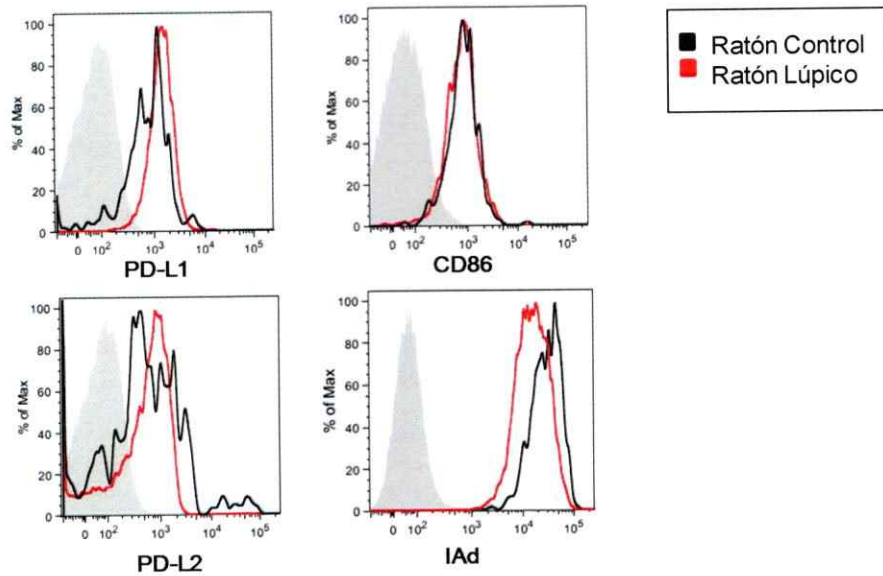


Figura suplementaria 4. Linfocitos B reguladores de bazo de ratones lúpicos expresan CD86, PD-L1, MHC-II (IAd) y PD-L2. A. Superposición de histogramas de fluorescencia de PD-L1, PD-L2, CD86 e IAd en LB reguladores (CD19+ CD11c- CD1dhi CD5+) de bazo de controles viejos Balb/c y lúpicos.

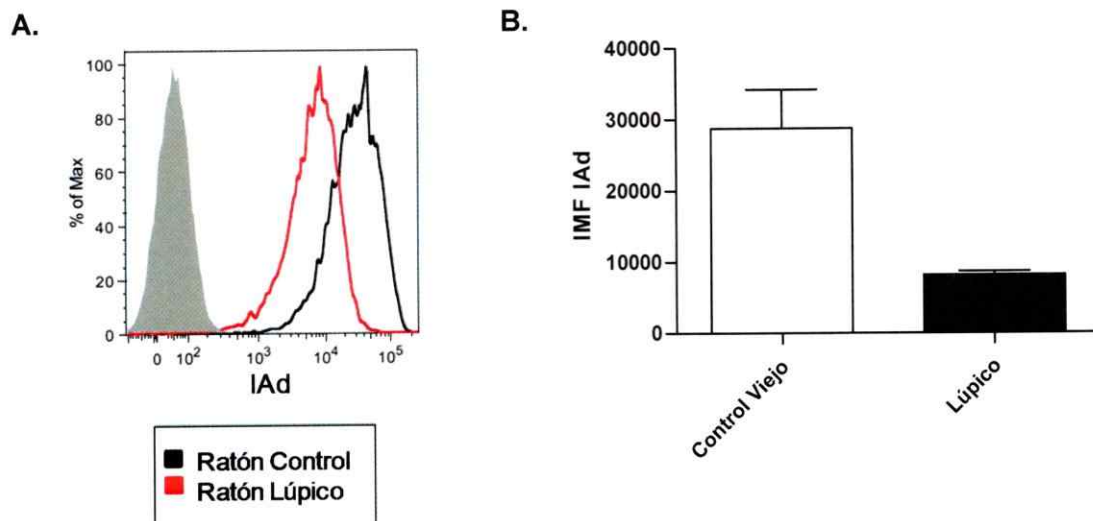
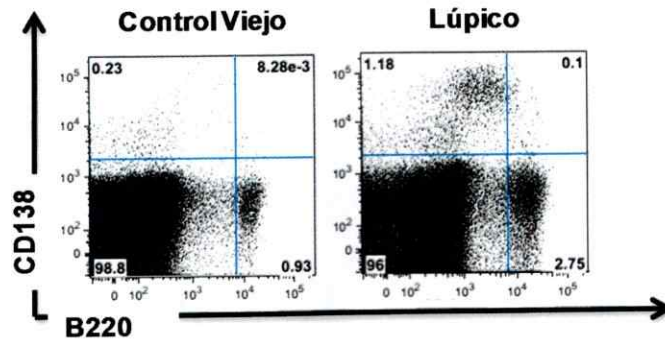


Figura suplementaria 5. Expresión de MHC II (IAd) en linfocitos B tímicos de ratones lúpicos **A.** Superposición de histogramas de fluorescencia para IAd a partir de una ventana CD19+CD11c- para LB tímicos de un ratón control viejo Balb/c en negro (n=5) y ratón lúpico en rojo (n=5). **C.** Cuantificación de los resultados mostrados en **B.** *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

A.



B.

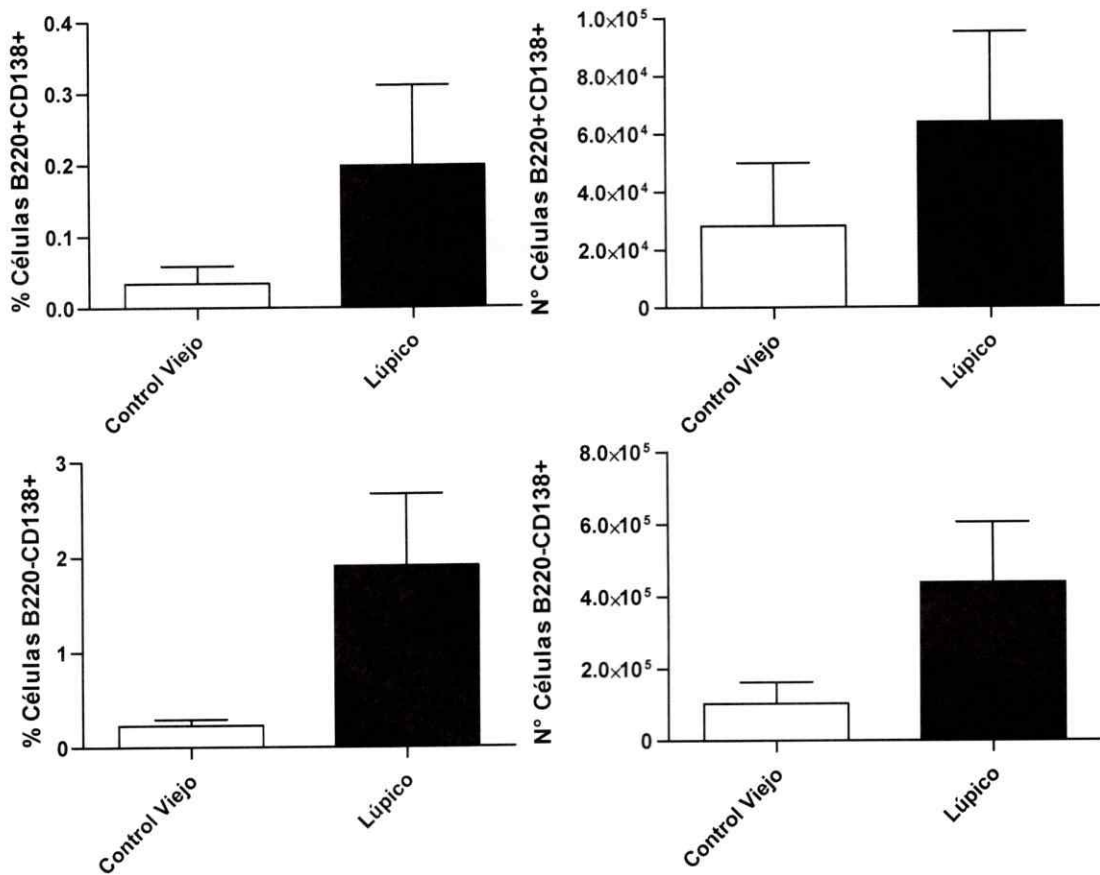


Figura suplementaria 6. Presencia de células plasmáticas en el timo de ratones lúpicos.

A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD138 y B220 en el timo de los ratones controles viejos Balb/c (n=5) y lúpicos (n=7). **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en A.

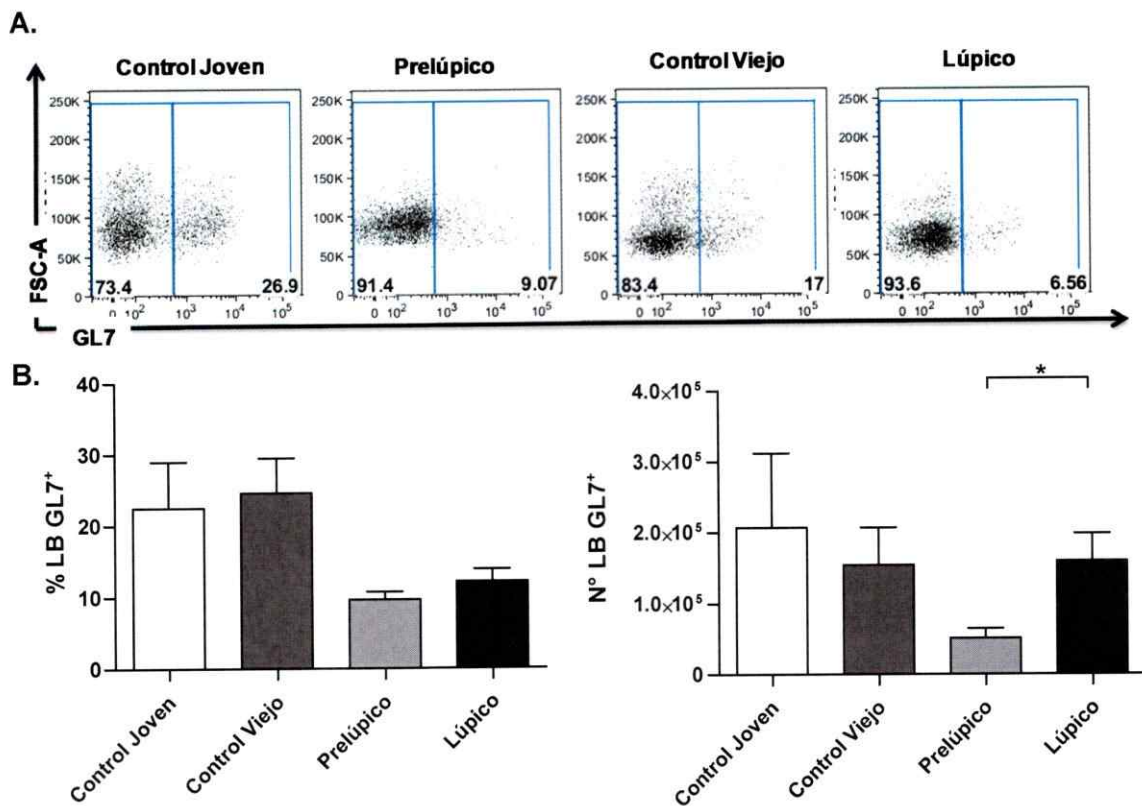


Figura suplementaria 7. Expresión de GL7 en linfocitos B de timo de ratones Lúpicos. A. Análisis de Citometría de flujo de la expresión de GL7 en la población de LB (CD19+CD11c-) de timo de ratones controles jóvenes Balb/c (n=9), prelúpicos (n=6), controles viejos Balb/c (n=10) y lúpicos (n=17). **B.** Cuantificación de los resultados obtenidos en A. *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.

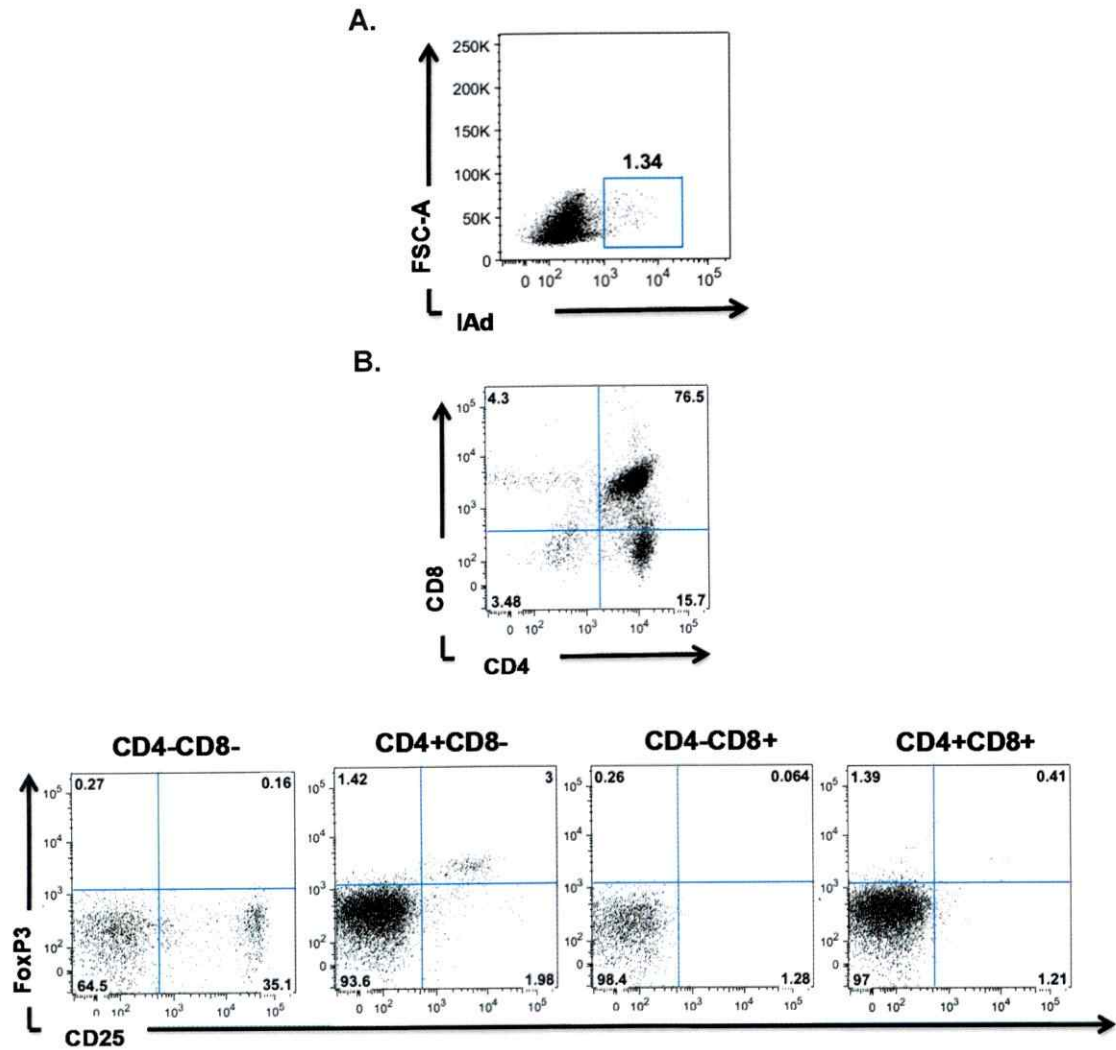


Figura suplementaria 8. Fenotipo de los Timocitos de ratones controles viejos NZW/Balb/c depletados de APC. A. Análisis de Citometría de flujo de la expresión de MHC II (IAd) en timocitos luego de la depleción. **B.** Análisis de Citometría de flujo de la expresión de CD4 v/s CD8 y de FoxP3 v/s CD25 en las distintas subpoblaciones CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4+CD8+ y CD4-CD8- en timocitos luego de la depleción

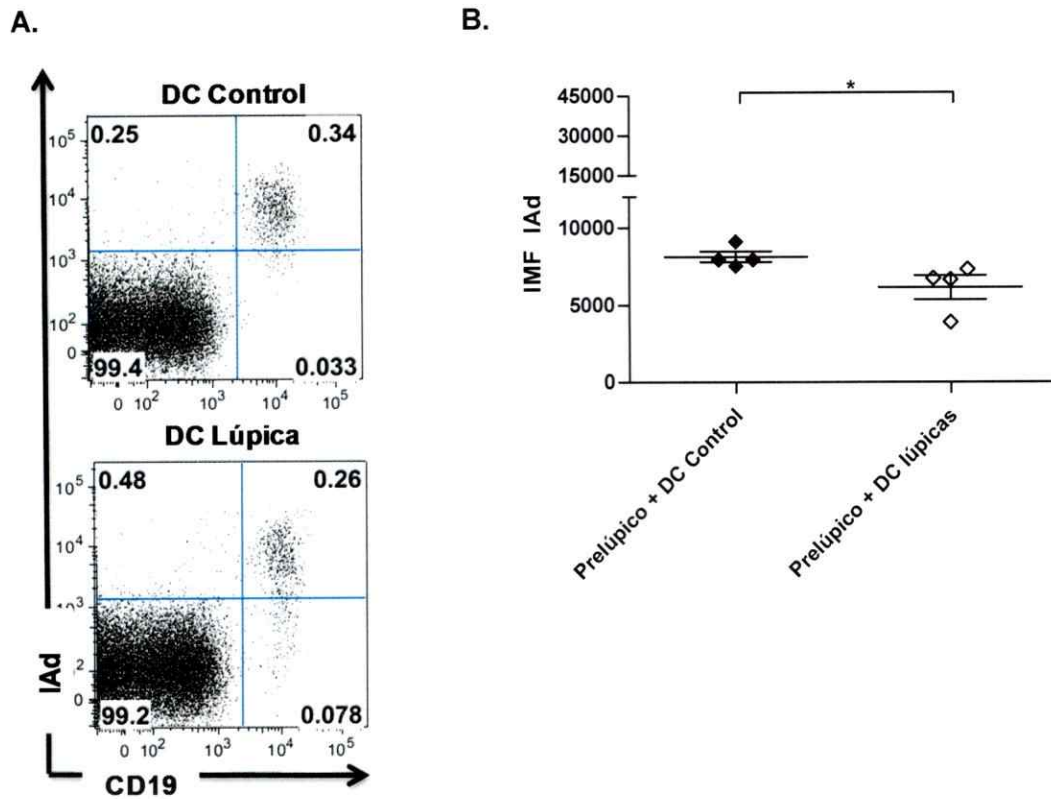


Figura suplementaria 9. Linfocitos B tímicos de ratones prelápicos tratados con DC de ratones lúpicos presentan una disminución en la expresión de MHC-II (IAd). A. Análisis de citometría de flujo para IAd y CD19 en LB tímicos (CD19+CD11c-) de un ratón preláptico inyectado con DC control o DC lúpicas. **B.** Cuantificación de los resultados mostrados en **A.** (n=4) *P<0,05. **P<0,001. ***P<0,0001.