

UCH-FC
DOC-BMCN
A 385
C.1

Ex. publico 19112/08.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADO

LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

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

Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular Y Neurociencias

Facultad De Ciencias
Universidad de Chile



Por

JENNIFER ELIZABETH ALFARO FORMAS

DIRECTOR DE TESIS: Dra. María Rosa Bono Merino
CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. Mario César Rosemblatt Silber

Santiago, Chile
2008

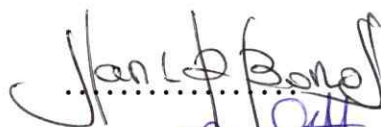
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

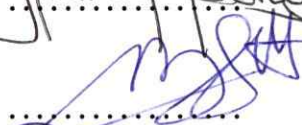
JENNIFER ELIZABETH ALFARO FORMAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de Julio del 2008.

Director de Tesis:
Dra. María Rosa Bono



Co-Director de Tesis
Dr. Mario Rosemblatt

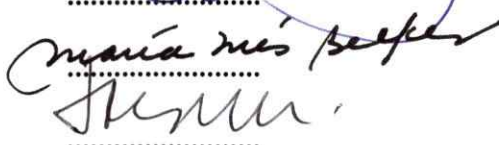


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Nuñez



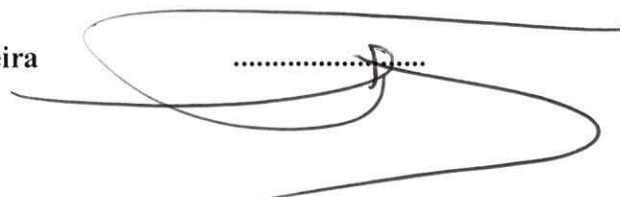
Dra. María Inés Becker



Dr. Sergio Jacobelli



Dr. Arturo Ferreira





BIOGRAFÍA



Yo nací un 12 de Junio de 1981 en Santiago de Chile. Mi enseñanza básica y media se distribuyeron entre tres establecimientos. Finalmente, fue el colegio Compañía de María Seminario, el cual en el 1998 me vio emigrar hacia la enseñanza superior. A esa altura de mi vida tenía dos cosas claras, primero que quería estudiar en la Universidad de Chile y segundo que mi pasión era la ciencia, específicamente la biología, a pesar de que salí de un curso matemático. Así que ingrese a Licenciatura en Ciencias con mención en Biología, egresando de esta carrera el año 2003. Mi siguiente paso en esta carrera científica, fue optar por un doctorado y nuevamente me incline por la casa de Bello. Durante mi doctorado descubrí otra pasión la inmunología, así pase 5 años de mi vida entre el laboratorio y los ratoncitos lúpicos, aunque siempre me di el tiempo de compartir con mis amigos, de salir y de tener hobbies, como jugar a la pelota, cantar en karaoke e ir a Pichilemu.

Ahora que ya termine esta etapa me siento muy emocionada, llena de esperanzas y ansiosa de saber el destino de mis siguientes pasos dentro de este mundo científico, siempre esperando que todas las cosas que me depare el futuro sean para mejor.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir por agradecer a mis tutores María Rosa Bono y Mario Roseblatt, en general por el apoyo y la libertad que me dieron durante la realización de este trabajo, lo cual me permitió adquirir la tan valorada independencia necesaria para ser un buen científico. A María Rosa en particular le quisiera agradecer sus múltiples palabras de apoyo y consejos asertivos, así como el voto de confianza que deposito en mí, ya que siempre sentí de su parte un apoyo incondicional tanto en las buenas como en las malas. A Mario en especial le quisiera agradecer porque siempre me mostro un punto de vista diferente, además de que siempre conté con su apoyo en todas las cosas que necesité.

En seguida me gustaría agradecerle a mi familia, en especial a mi madre Gloria Formas y a mi hermano Christian Alfaro, ambos discutieron conmigo cada vez que lo necesite. A pesar de que su área es la computación, siempre me entregaron apoyo y lo más importante otra visión no biológica de los problemas. Obviamente dentro de mi familia no puedo olvidar a mi abuelita Teresa Aravena y mis tíos y primos mas cercaron. Sé que ellos siempre se sintieron orgullosos de lo que hacía, aunque siempre me cambiaran el nombre de la carrera.

Por otra parte, están mis compañeros y amigos del laboratorio de Inmunología, Jaime de Calisto, Gonzalo Ureta, Leonardo Vargas, Raúl Elgueta, Valerie Ramirez, Andrés Ramirez, Cinthia Silva, Daniela Sauma, Pablo Espejo, Fernando Sepúlveda,

Jocelyne Neira, Pablo Vargas, Paula Michea, Valezka Simon, Eva Mella y Pamela Palma. Algunos de ellos no se encuentran hoy en el laboratorio, pero siempre estuvieron ahí para darme una mano tanto en el diseño como en el desarrollo de los experimento, o simplemente escuchando las cosas cotidianas e importantes que me ocurrieron durante todos estos años. En especial le agradezco a Paola Solanes por su amistad, compañía y paciencia, por todas nuestras travesías tanto en la ciencia y como en la vida, amiga te quiero, a Paz Reyes por su amistad y buenos consejos, la visión más aterrizada y de responsabilidad, que siempre me ayudaba a poner los pies en la tierra, a Carolina Alarcón por su amistad y todos los consejos y vivencias que compartimos en nuestros múltiples viajes en el auto y en el día a día en el laboratorio, finalmente a Alejandra Gleisner por su amistad y su ayuda con los experimentos y por todos los momentos que compartimos tanto en futbol así como en la vida en general.

No me podría olvidar de mis amigas, mis polillas, las que desde que entre a la universidad han estado conmigo, en las buenas y en las malas, siempre sintiéndose orgullosas de su amiga, en este minuto les retribuyo todo ese apoyo, haciéndoles una mención especial a todas ustedes, Carolina Herrera, Alejandra Martínez, María Irene Moreno, Mariela Millar y Rocío Marín. También me gustaría agradecerle en especial a Juan Rodríguez, el cual siempre me dio su apoyo y cariño.

Además, agradezco la oportunidad que me dio, el doctor Loren Erickson, el cual sin realmente conocerme me permitió ir a su laboratorio a realizar experimentos como parte de mi tesis, los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de la misma.

Gracias, por todas las palabras de apoyo y el voto de confianza que deposito en mí. Además debo mencionar a las personas que fueron muy importantes durante mi estadía en Estados Unidos y que me brindaron su amistad y apoyo mientras me encontraba fuera de mi país, Chao Yiang, William Loo, Sephat y Joan Yuan. Les agradezco mucho todo lo que hicieron por mí.



Agradezco el fundamental apoyo financiero de las siguientes instituciones:

Beca de CONICYT para estudios de Doctorado

Proyecto FONDECYT regulares 1060834 y 1060253

Beca del Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology (MIFAB)

Beca del Departamento de Postgrado, Universidad de Chile

Proyecto N°23-04, Universidad Andrés Bello.

Proyecto RED15, Universidad Católica de Chile y MIFAB.





ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	ii
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	iv
Índice de abreviaturas	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
- Lupus Eritematoso Sistémico	1
- Células dendríticas y el lupus	3
- Células dendríticas y receptores Toll	6
- Citoquinas y lupus	8
- Células dendríticas y linfocitos B	10
- Modelos murinos de lupus	11
• Ratones BWF1	11
• Ratones B6.Nba2	12
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos específicos	14
Materiales y métodos	15
- Ratones	15
- Materiales	15
- Obtención de sueros para ELISA	16
- ELISA de anticuerpos anti-ADN de doble hebra (ADN-dh)	16
- Extracción de núcleos de esplenocitos	17
- ELISA para la detección de anticuerpos antinucleares (ANA)	18
- ELISA para la detección de anticuerpos anti-histonas	19
- ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADNhs	20
- Citometría de flujo	21



- Generación de células dendríticas de médula ósea (BMDCs)	22
- Activación de BMDCs	23
- ELISA de captura para las citoquinas IL-10 e IL-6	23
- Purificación de células dendríticas (DCs) de bazo	24
- Purificación de las DCs de bazo mediante <i>cell sorting</i>	25
- Activación de las DCs de bazo	25
- Tinción de Giemsa	26
- Co-cultivo de linfocitos B con DCs de bazo	26
- Análisis estadístico	27
Resultados	28
- Los ratones lúpicos presentan niveles elevados de auto-anticuerpos en el suero, los cuales se correlacionan con la presencia de la región central del locus Nba2.	28
- Las BMDCs de ratones lúpicos presentan un fenotipo similar al de BMDCs de ratones normales y no muestran diferencias en su capacidad de secreción de IL-10 en respuesta a LPS o CpG.	30
- El bazo de ratones lúpicos posee un mayor porcentaje de pDCs y un mayor número absoluto de cDCs y de pDCs comparado con el bazo de ratones normales.	34
- Las DCs de bazo de ratones lúpicos presentan una alteración en la expresión de CD86 y MHC-II comparadas con DCs de bazo de ratones normales.	36
- Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan mayores niveles de IL-10 comparadas con DCs de bazo de ratones normales en respuesta a LPS o CpG, lo cual se correlaciona con la presencia de la región central del locus Nba2.	39
- Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan niveles similares de IL-6 en respuesta a LPS o CpG comparadas con DCs de bazo de ratones normales.	41
- Las DCs de bazo de ratones L5 purificadas por <i>cell sorting</i> secretan mayores niveles de IL-10, en respuesta a CpG, comparadas con DCs de bazo de ratones normales.	41
- El bazo de los ratones lúpicos posee un mayor porcentaje y número absoluto de la subpoblación de DCs CD19 ⁺ .	44
- Las DCs de bazo CD19 ⁺ y CD19 ⁻ de ratones lúpicos secretan niveles elevados similares de IL-10 en respuesta a CpG.	46
- Las DCs del bazo de ratones lúpicos L5 son más eficientes en inducir la diferenciación de linfocitos B normales a células plasmáticas en presencia de CpG.	48
Discusión	50



Conclusión	66
Anexos	67
Referencias	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de células en la médula ósea	31
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del locus de susceptibilidad Nba2	13
Figura 2. Los ratones con susceptibilidad al lupus BWF1, L5 y L13 desarrollan altos niveles de auto-anticuerpos en el suero comparado con ratones normales B6 o NZWxBalb/c F1	29
Figura 3. El fenotipo de las BMDCs generadas a partir de precursores de médula ósea de ratones con lupus es similar al de las BMDCs generadas de precursores de médula ósea normales	32
Figura 4: Las BMDCs de ratones con susceptibilidad al lupus secretan similares niveles de IL-10 en respuesta a estímulos TLR comparadas con BMDCs controles	33
Figura 5. El bazo de ratones con susceptibilidad al lupus posee un mayor porcentaje de pDCs (CD11c ⁺ B220 ⁺) y un mayor número absoluto de pDCs y cDCs (CD11c ⁺ B220 ⁻)	35

Figura 6. Las pDCs de ratones lúpicos presentan una menor expresión de CD86 y una mayor expresión de MHC-II comparadas con pDCs de ratones normales	37
Figura 7. Las cDC de ratones L9, L13 y BWF1 expresan menos MHC-II comparadas con las cDCs de ratones normales	38
Figura 8: Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a estímulos TLR comparadas con DCs de bazo de ratones normales, lo cual se restringe a la presencia del segmento central del locus Nba2	40
Figura 9: Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan similares niveles de IL-6 en respuesta a estímulos TLR comparadas con DCs de bazo de ratones normales	42
Figura 10: DCs de bazo de ratones L5 purificadas por <i>cell sorting</i> secretan mayores niveles de IL-10 en comparación con DCs de bazo de ratones normales solo en respuesta a CpG	43
Figura 11. Los ratones con susceptibilidad al lupus poseen un mayor porcentaje y número de DCs CD19 ⁺ B220 ⁺ , incremento que depende de la edad del ratón	45
Figura 12. Las DCs de bazo CD11c ⁺ CD19 ⁺ y CD11c ⁺ CD19 ⁻ provenientes de ratones lúpicos L5 secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a CpG comparada con DCs de ratones normales	47
Figura 13. Las DCs de bazo de ratones L5 son más eficientes en la generación de células plasmáticas en presencia de CpG.	49



ABREVIATURAS

En orden alfabético

2-ME:	<i>2-mercapto-ethanol</i>
7AAD:	<i>7-amino-actinomycin-D</i>
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNdh:	ADN de doble hebra
ADNhs:	ADN de hebra simple
ANA:	Anticuerpos antinucleares
APC:	<i>Allophycocyanin</i>
APRIL:	<i>A proliferation inducing ligand</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
B6:	C57B16
BAFF:	<i>B cell activating factor</i>
BMDCs:	Células dendríticas de médula ósea
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i>
BWF1:	<i>(New Zealand Black x New Zealand White) F1</i>
CD:	<i>Cluster Differentiation</i>
cDCs:	Células dendríticas convencionales
CpG:	Dinucleótidos de citidina fostato guanosina
DCs:	Células dendríticas
DTT:	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA:	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ETOH:	Etanol
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos
FcγRII:	Receptor Fc gama de tipo II
FCS:	<i>Fetal calf serum</i>
FITC:	<i>Fluorescein iso thyo-cyanate</i>
HBSS:	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HEPES:	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HRP:	<i>Horse radish peroxidase</i>
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
LES:	Lupus Eritematoso Sistémico
LPS:	Lipopolisacárido
MHC-II:	Moléculas de histocompatibilidad de clase II
Nba2:	<i>New Zealand autoimmunity</i>
NRS:	Suero normal de rata
NZB:	<i>New Zealand black</i>
NZW:	<i>New Zealand white</i>

PBS: *Phosphate buffered saline*
pDCs: *Células dendríticas plasmacitoides*
PE Cy: *Phycoerythrin cyanine*
PI: *Ioduro de propidio*
PMSF: *Phenylmethylysulphonyl fluoride*
R837: *Imiquimod*
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
SSC: *Standard sodium citrate*
TLRs: *Receptores tipo Toll*
TMB: *Tetramethylbenzidine*

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de linfocitos B y T auto-reactivos, la producción de auto-anticuerpos y la desregulación de varias citoquinas. Dado que las células dendríticas (DCs) son las únicas células presentadoras de antígenos profesionales capaces de activar a linfocitos T vírgenes, en esta tesis se decidió estudiar el papel de estas células en el desarrollo del LES. Se caracterizaron las DCs del bazo y las derivadas de precursores de médula ósea (BMDCs) en diferentes modelos murinos de lupus. Se encontró que las BMDCs de ratones lúpicos no presentan diferencias, ni en el fenotipo, ni en la secreción de IL-10 comparadas con BMDCs de ratones normales. Por el contrario, demostramos que las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a CpG comparadas con DCs de ratones normales. La utilización de ratones que contienen diferentes regiones del locus de susceptibilidad Nba2, nos permitió demostrar que el aumento en la secreción de IL-10 en los ratones lúpicos está restringido a la presencia de la región central del locus Nba2. Por el contrario, las DCs de bazo de ratones lúpicos en presencia de CpG inducen un mayor porcentaje de células plasmáticas comparadas con las DC de bazo de ratones normales, lo cual se podría asociar a la presencia del locus Nba2 completo. Los resultados en este trabajo sugieren que las DCs de ratones lúpicos poseen un fenotipo que favorece el desarrollo del lupus.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the presence of autoreactive B and T cells, autoantibody production and cytokines deregulations. Since Dendritic cells (DCs) are the major professional antigen presenting cells capable to activate naïve T lymphocytes, in this study we investigated the role of these cells in the development of lupus. We characterized DCs derived from bone marrow precursors and isolated from spleens in different lupus murine models. We found that BMDCs from lupus mice have a similar phenotype and capacity to secrete IL-10 in response to CpG and LPS compared to BMDCs from normal mice. On the contrary, splenic DCs from lupus mice secrete higher levels of IL-10 in response to CpG compared to splenic DCs from normal mice. The use of different Nba2 lupus lines let us to correlate the higher IL-10 secretion showed by lupus DCs to the central region of the Nba2 locus. Furthermore, lupus DCs induce a higher percentage of plasma cells in the presence of CpG compared to normal DCs, a result that can be associated to the complete Nba2 locus. These results strongly suggest that lupus DCs have a phenotype that favors the disease development.

INTRODUCCIÓN

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica, de etiología desconocida que afecta varios órganos, entre los cuales se encuentran el riñón, la piel, las articulaciones, el sistema nervioso, el corazón, los pulmones y la sangre (McCowan 1998). El LES es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres en edad fértil y tiene una prevalencia de entre 40-200 casos por cada 100.000 personas. Los pacientes con LES presentan períodos de crisis y remisión de la enfermedad independientes del tratamiento que reciban. Siendo las principales manifestaciones clínicas en estos pacientes la artritis, erupciones en la piel y glomerulonefritis (Rahman and Isenberg 2008).

El inicio del daño renal se ha asociado a un aumento en los niveles de los auto-anticuerpos anti-ADN, los cuales corresponden principalmente a los isotipos de inmunoglobulinas (Ig) fijadoras del complemento IgG1 e IgG3. Los complejos inmunes formados entre estos auto-anticuerpos y ADN se depositan en la membrana basal del glomérulo renal, en las uniones epidermis-dermis de la piel o en los plexos coroideos. Los depósitos renales activan la cascada del complemento y reclutan a neutrófilos, los cuales inducen una serie de eventos que culminan con el daño inflamatorio de la membrana basal (glomerulonefritis), la liberación de proteínas en la orina y el

consecuente desarrollo de proteinuria (Carroll 2004).

El origen del LES es una combinación de factores genéticos, ambientales e inmunológicos. En el contexto inmunológico éste se caracteriza por la sobreproducción de auto-anticuerpos, los cuales son específicos para antígenos propios como el ADN, proteínas nucleares y algunos componentes del citoplasma. Estos auto-anticuerpos son principalmente del tipo IgG, evidenciando la participación de los linfocitos T de ayuda, los cuales son fundamentales para que ocurra un cambio de clase en las inmunoglobulinas. La principal fuente de antígenos en el LES son los cuerpos apoptóticos, los cuales contienen proteínas nucleares y cromatina, que a su vez son los principales blancos de los auto-anticuerpos en el lupus (Carroll 2004)

El LES se considera como un desorden mediado por linfocitos B, los cuales se diferencian a células plasmáticas que son las células secretoras de anticuerpos. Estos linfocitos para diferenciarse a células plasmáticas necesitan del antígeno y de la co-estimulación de los linfocitos T de ayuda, los cuales deben estar previamente activados. Existen estudios que muestran que la enfermedad no se desarrolla si los linfocitos B se eliminan, probablemente debido a la ausencia de células plasmáticas productoras de los auto-anticuerpos patogénicos (Shlomchik, Madaio et al. 1994).

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras profesionales de antígenos capaces de interactuar tanto con los linfocitos T, como con los linfocitos B y son las únicas capaces de activar a linfocitos T vírgenes. Se ha demostrado que las DCs

pueden promover directamente la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas. Es por esto que las DCs son fuertes candidatas para tener un papel importante en la iniciación de respuestas autoinmunes como ocurre en el lupus.

CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LUPUS

Las células dendríticas (DCs) inducen, sostienen y regulan la respuesta inmune. Las DCs inmaduras presentan una baja expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40. Las DCs se encuentran en los tejidos periféricos censando la presencia de patógenos, tejidos necróticos e inflamación. Estas señales inducen la maduración (aumento en la expresión de los marcadores ya mencionados) de las DCs y la migración hacia los órganos linfoides secundarios. Allí las DCs presentan a los linfocitos T CD4+ los antígenos procesados y cargados en las moléculas de MHC-II, lo cual induce la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T a linfocitos T de ayuda. Las DCs inmaduras también capturan antígenos propios (células apoptóticas) los que al ser presentados a los linfocitos T, en ausencia de las señales apropiadas de co-estimulación, generan tolerancia (Banchereau, Pascual et al. 2004).

El estudio de las DCs, las cuales se encuentran en muy bajas proporciones en el bazo (1-2% de las células del bazo), se ha beneficiado de métodos para diferenciar DCs a partir de precursores de médula ósea diferenciados en presencia del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Marland, Bakker et

al. 1996).

Las DCs de ratón se dividen principalmente en dos subpoblaciones, las DCs convencionales (cDCs) las cuales se caracterizan por ser CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺ y las DCs plasmacitoides (pDCs) las cuales son CD11c⁺ B220⁺ CD11b⁻. Estas representan las dos principales subpoblaciones de DCs del bazo. Las cDCs se especializan en la activación de linfocitos T efectores y las pDCs juegan un rol en la regulación de la función de los linfocitos T reguladores y son las principales células productoras de Interferon- α (Angelov, Tomkowiak et al. 2005). Ambas subpoblaciones expresan el marcador de linaje CD11c y los marcadores de superficie MHC-II, CD86 y CD40 (Banchereau, Briere et al. 2000).

Diversos trabajos sugieren un papel importante de las DCs en la iniciación de procesos de autoinmunidad (Bayry, Thirion et al. 2004) y particularmente en el LES (Crispin and Alcocer-Varela 2007). Con respecto al fenotipo de las DCs en humanos, algunos estudios reportan que las DCs de pacientes con lupus poseen un fenotipo normal o incluso que expresan bajos niveles de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, y que son pobres estimuladores de una respuesta linfocitaria mixta (Scheinecker, Zwolfer et al. 2001; Koller, Zwolfer et al. 2004), mientras que otros estudios muestran que estas DCs exhiben un fenotipo más activador (Decker, Kotter et al. 2006; Ding, Mehta et al. 2006). En ratones tampoco hay un consenso acerca del fenotipo de las DCs. En ratones lúpicos se ha reportado que las DC poseen una capacidad de presentación antigénica

disminuida (Phillips, Lomnitzer et al. 1988) o aumentada (Zhu, Liu et al. 2005; Wan, Xia et al. 2007), siendo la principal diferencia entre estos informes la cepa de los diferentes modelos de lupus utilizados en cada caso, lo que sugiere que el fenotipo de las DCs es altamente dependiente del fondo genético de cada cepa.

Respecto a la frecuencia de las DCs en los pacientes con lupus, se ha reportado una disminución del porcentaje de DCs, tanto pDCs como cDCs en la sangre periférica de pacientes con lupus. (Cederblad, Blomberg et al. 1998; Blanco, Palucka et al. 2001; Blomberg, Eloranta et al. 2003). Esto sugiere que las DCs estarían migrando a los tejidos blancos del LES (Farkas, Beiske et al. 2001) o que hay un defecto en la generación y/o en la sobrevivencia de las DCs en estos pacientes. En ratones, contrario a lo ocurrido en humanos, se ha mostrado una acumulación de DCs CD11b+CD11c+ en la sangre periférica de ratones con lupus (Ishikawa, Nagai et al. 2002). Por otra parte, se ha encontrado una acumulación de DCs en el bazo de ratones con lupus (Kalled, Cutler et al. 2001). Estas DCs se acumulan tanto en las áreas T (Fields, Sokol et al. 2001) como en las áreas B (Ishikawa, Sato et al. 2001) de los linfonodos de los ratones.

En relación a la funcionalidad de las DCs en el lupus, se ha determinado que DCs singénicas cargadas con auto-antígenos pueden acelerar el desarrollo de la enfermedad en un modelo murino de LES (Bondanza, Zimmermann et al. 2003). También se ha determinado que DCs cargadas con células necróticas inducen la producción de anticuerpos anti-ADN de doble hebra en una cepa no autoinmune C57BL/6. Sin embargo, esto no lleva al desarrollo de todas las manifestaciones características del

lupus, a menos que las DCs sean inyectadas en una cepa susceptible a la enfermedad (Georgiev, Agle et al. 2005; Ma, Chan et al. 2005).

Se cree que todas las DCs tienen la capacidad de inducir tolerancia e inmunidad dependiendo de su estado de maduración. Las DCs constantemente presentan antígenos propios en un estado quiescente, lo que es importante para la mantención de la tolerancia. La inmunidad se produciría cuando patógenos invasores otorgan señales de peligro que inducirían la maduración en la DCs (Shortman and Liu 2002). Las infecciones virales o bacterianas son frecuentemente asociadas al desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas (Banchereau, Pascual et al. 2004; Chen, Lin et al. 2005) como el LES. La presentación de antígenos propios por parte de las DCs, en un contexto infeccioso puede llevar al desarrollo de una respuesta autoinmune, como la encontrada en el lupus.

CÉLULAS DENDRÍTICAS Y RECEPTORES TOLL

El sistema inmune reconoce a los patógenos a través de receptores, los cuales reconocen patrones conservados presentes en los microorganismos. Uno de estos receptores son los receptores de tipo Toll (TLRs). Existen más de 10 TLRs descritos hasta la fecha, los cuales se expresan por una variedad de células entre las cuales se encuentran las DCs. Los ligandos de los TLRs incluyen una variedad de moléculas con fuerte actividad adyuvante, por ejemplo el lipopolisacárido y el ADN de bacterias. Estos ligandos inducen la maduración de las DCs y de otras células presentadoras lo que

permite la presentación efectiva de los productos microbianos a las células efectoras del sistema inmune como son los linfocitos T y B (Marshak-Rothstein 2006).

TLR-4 es un receptor para el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de las bacterias gram negativas. Es expresado en una variedad de células principalmente en células del sistema inmune como macrófagos y DCs (Pasare and Medzhitov 2004). Se ha encontrado que el aumento de la expresión génica de *tlr4* induce el desarrollo de una glomerulonefritis similar a la encontrada en el lupus (Shi, Wang et al. 2007). Además se ha encontrado que DCs aisladas a partir de ratones con lupus y activadas con LPS son deficientes en su capacidad de reprimir la secreción de auto-anticuerpos por parte de las células plasmáticas (Gilbert, Carnathan et al. 2007), por lo que el TLR-4 y su principal ligando LPS podrían cumplir un papel a través de las DCs en la patogénesis del lupus.

Otro receptor, el TLR-9 es un receptor intracelular el cual reconoce motivos hipometilados de CpG presentes en el ADN de virus y bacterias. La activación del TLR-9 requiere la internalización de los antígenos hacia el compartimiento endosomal tardío o hacia el compartimiento lisosomal (Pasare and Medzhitov 2004). Estudios recientes han demostrado que algunos TLRs, especialmente el TLR-9 y el TLR-7, están asociados con el desarrollo del LES. Se ha determinado que complejos inmunes presentes en el suero de pacientes con lupus son capaces de inducir la expresión del ARN mensajero de citoquinas en células transfectadas con TLR-9 y FcRIIa, lo que indica que el TLR-9 podría ser uno de los receptores que están participando en la iniciación o mantenimiento de la respuesta autoinmune característica del lupus (Means, Latz et al. 2005). Además,

se ha determinado que la inyección de CpG (ligando del TLR-9) en ratones con lupus acelera el desarrollo de la glomerulonefritis. Este CpG actúa a varios niveles entre los cuales se ha propuesto la activación de DCs (Pawar, Patole et al. 2006). Más aún, secuencias inhibitorias de los TLR-7 y TLR-9 disminuyen los niveles de anticuerpos anti-ADN de doble hebra y previenen el daño del riñón (Pawar, Ramanjaneyulu et al. 2007). Por lo tanto los ligandos de TLR-9 (CpG) y TLR-7 (R837) podrían jugar un papel importante en la iniciación de la respuesta autoinmune en el lupus a través de la activación de las DCs.

CITOQUINAS Y LUPUS

El reconocimiento de los patógenos por las DCs es extremadamente dependiente de los receptores TLRs. La naturaleza de los patógenos modularía el tipo de citoquinas que las DCs secretan permitiendo que ellas induzcan diferentes tipos de respuestas inmunes. (Reis e Sousa, Diebold et al. 2003).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por una variedad de células, las cuales cumplen un rol fundamental en el desarrollo, diferenciación y regulación de las células de la respuesta inmune. Es por esto que una desregulación de la producción de citoquinas o de la acción de éstas podría jugar un papel central en el desarrollo de autoinmunidad y en el de enfermedades autoinmunes (Horwitz and Jacob 1994; O'Shea, Ma et al. 2002).

Interleuquina-10 (IL-10) es una citoquina predominantemente anti-inflamatoria que inhibe la actividad de los macrófagos y de las DCs, aunque se ha demostrado que puede adquirir una actividad pro-inflamatoria durante el desarrollo de la respuesta inmune (Sharif, Tassiulas et al. 2004). En ratones, las subpoblaciones de DCs del bazo CD8⁺ y CD8-CD4⁻ tienen la capacidad de producir tanto IL-12 p70 como IL-10, dependiendo de la naturaleza del patógeno. Por el contrario, la subpoblación de DC CD4⁺ es incapaz de producir IL-12 p70 en respuesta a los mismos estímulos (Reis e Sousa, Diebold et al. 2003).

Existen diversos estudios que relacionan a la IL-10 como un factor clave en la patogénesis del lupus. En humanos, se ha encontrado un aumento de IL-10 en el suero de pacientes con lupus comparado con individuos control. Además, el título de IL-10 en el suero se correlaciona con la actividad de la enfermedad y con la producción de auto-anticuerpos contra ADN de doble hebra (Park, Lee et al. 1998; Chun, Chung et al. 2007).

IL-10 estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B humanos a células plasmáticas (Rousset, Garcia et al. 1992). Además, se ha demostrado que la adición de IL-10 aumenta la producción espontánea de las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA producidas por las células mononucleares de la sangre periférica de pacientes con lupus (Llorente, Zou et al. 1995). Por otra parte, un estudio en 6 pacientes con lupus demostró que el tratamiento con un anticuerpo anti- IL-10 es capaz de revertir las lesiones cutáneas y los problemas reumatológicos presentes en estos pacientes (Llorente,

Richaud-Patin et al. 2000). En un modelo murino de lupus (BWFI) el tratamiento con anticuerpos anti-IL-10 retrasa el desarrollo de las manifestaciones de la enfermedad y por el contrario, la continua administración de IL-10 en ratones con susceptibilidad al lupus acelera el desarrollo de la enfermedad (Ishida, Muchamuel et al. 1994). Sin embargo, la misma cantidad de IL-10 administrada a una cepa no autoinmune no induce los síntomas de enfermedad, por lo que IL-10 por sí sola no sería capaz de inducir la enfermedad en ratones normales. Todos estos antecedentes sugieren que IL-10 cumpliría un rol patológico en el desarrollo de la enfermedad.

CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LINFOCITOS B

Los linfocitos B son activados gracias al reconocimiento del antígeno a través del entrecruzamiento de los receptores de los linfocitos B y de la co-estimulación de los linfocitos T de ayuda, además se ha sugerido que los linfocitos B pueden bajar su umbral de activación gracias al entrecruzamiento de los receptores del complemento en los linfocitos B (Carroll 2004). Se ha determinado que las DCs foliculares expresan receptores del complemento y se ha visto que la expresión de estos receptores es importante para el desarrollo de la respuesta humoral (Fang, Xu et al. 1998). Por otra parte, las DCs pueden internalizar el antígeno para ser presentado a los linfocitos T y además pueden reciclar los antígenos, en forma intacta, hacia la superficie celular, donde ahora se encuentran disponibles para ser capturados por los linfocitos B (Wykes, Pombo et al. 1998). Los complejos inmunes capturados por la DCs a través del receptor FcγRIIB son retenidos en un compartimento vesicular no degradativo por hasta 48h y

son presentados a linfocitos B vírgenes (Bergtold, Desai et al. 2005), por lo tanto las DCs pueden actuar como fuente de antígeno para los linfocitos B y así ayudar directamente en su activación. En un estudio por microscopía intravital de dos fotones se muestra la interacción directa de DCs y linfocitos B en la región extrafolicular en los linfonodos. Esta interacción es requerida para que los linfocitos B reconozcan su antígeno, lo que resalta la importancia de las DCs en la inducción de la respuesta inmune humoral (Qi, Egen et al. 2006). Tanto las cDCs, como las pDCs se han descrito como reguladores positivos de la inmunidad, al promover el crecimiento y la diferenciación de células B a células plasmáticas, a través de la secreción de IL-12, IL-6, IL-10, BAFF y APRIL (Balazs, Martin et al. 2002; MacLennan and Vinuesa 2002; Jego, Palucka et al. 2003). Las DCs pueden modular directamente el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B (Dubois, Vanbervliet et al. 1997; Fayette, Durand et al. 1998). Todos estos antecedentes sugieren que un defecto en las DCs podría desencadenar la activación y diferenciación descontrolada de la respuesta inmune humoral, lo que tendría una gran relevancia para el desarrollo y la mantención del lupus.

MODELOS MURINOS DE LUPUS

RATONES BWF1

El modelo murino BWF1 es una cruce de las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW). Esta cepa desarrolla espontáneamente una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos antinucleares (ANA) y por el desarrollo de una glomerulonefritis fatal mediada por complejos inmunes. El 50% de los

ratones muere alrededor de los 9 meses. Los anticuerpos antinucleares poseen múltiples especificidades contra diferentes antígenos entre los cuales se encuentran el ADN de simple hebra (ADN-sh), el ADN de doble hebra (ADN-dh), el ARN y complejos de proteínas nucleares con ácidos nucleicos (Gioud, Kotzin et al. 1983). En este modelo las hembras son más susceptibles a desarrollar la enfermedad que los machos (Gubbels, Jorgensen et al. 2005). Estas características se asemejan a las encontradas en el lupus humano. Estos ratones ofrecen un excelente modelo para el estudio de varias de las anomalías inmunológicas características del lupus.

RATONES B6Nba2

El desarrollo de cepas congénicas del modelo BWF1, las cuales expresan diferentes segmentos de los genomas de las cepas parentales NZB y NZW en un fondo genético no autoinmune, ha permitido la identificación de varias regiones de susceptibilidad al lupus. El ratón B6.Nba2, el cual expresa la región de susceptibilidad del lupus Nba2 (*New Zealand Black autoimmunity 2*) derivado del cromosoma 1 distal de la cepa parental NZB, desarrolla niveles elevados de anticuerpos antinucleares en el suero y el depósito de complejos inmunes en el glomérulo del riñón, el cual sin embargo no desarrolla glomerulonefritis y por lo tanto no muestra un daño renal (Clynes, Dumitru et al. 1998). Cuando la cepa B6.Nba2 se cruza con la cepa NZW estos ratones desarrollan auto-anticuerpos y daño renal casi idénticos a los encontrados en el modelo BWF1, lo que sugiere que la región Nba2 es una de las mayores contribuyentes a la enfermedad derivados de la cepa NZB. Además, esto nos permite separar los fenómenos

relacionados a la producción de auto-anticuerpos de aquellos relacionados al daño renal. Los ratones B6.Nba2 comparados con los ratones B6 muestran un aumento de las células del bazo, tanto en células B como en células T. Otros estudios han relacionado al locus Nba2 con anomalías en los linfocitos B (Atencio, Amano et al. 2004). Sin embargo, no existen actualmente estudios relacionados con la función de las DCs en este modelo, lo cual lo convierte en un modelo interesante para el estudio de estas células.

Además del modelo B6.Nba2, en este trabajo se utilizaron otras cepas congénicas al modelo B6.Nba2. En estas cepas se introdujeron distintos segmentos del locus Nba2 en un fondo genético normal C57-B16 (B6). Estos ratones se denominan L5, L9, L11, L12 y L13 (Figura 1), dentro de los cuales L5 contiene el locus Nba2 completo.

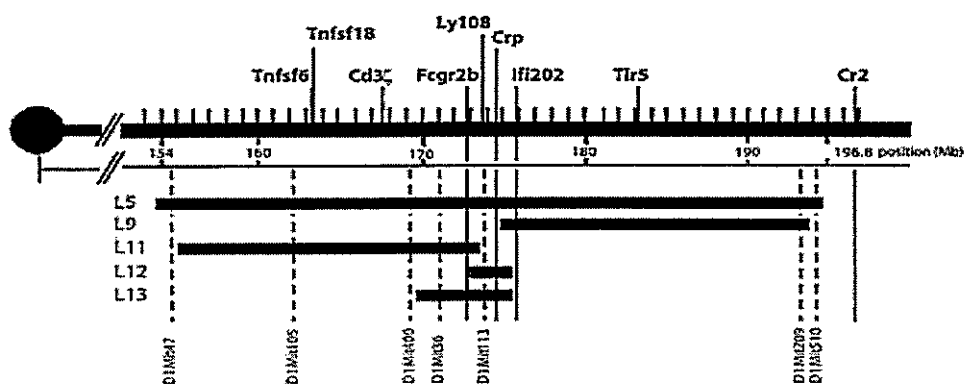


Figura 1. Mapa del locus de susceptibilidad Nba2. La figura muestra el mapa de la región de susceptibilidad Nba2. Esta región pertenece al cromosoma 1 de la cepa de ratones NZB. El ratón L5 posee el locus Nba2 completo. Los ratones L9, L11, L12 y L13 poseen diferentes segmentos de este locus.

HIPÓTESIS

Las células dendríticas provenientes de ratones con lupus tienen un defecto que les permite iniciar o mantener una respuesta autoinmune. Este defecto podría deberse a una alteración intrínseca de la célula dendrítica o a una alteración provocada por una diferenciación o maduración en un microambiente anormal.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el rol de las células dendríticas en un modelo murino de Lupus Eritematoso Sistémico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el fenotipo de DCs derivadas de precursores de médula ósea y de DCs de bazo de ratones con lupus y normales.
2. Comparar la funcionalidad de las células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea y de las DCs de bazo de ratones con lupus y normales en respuesta a diferentes estímulos patogénicos.
3. Evaluar la influencia de DCs derivadas de precursores de médula ósea y de DCs de bazo de ratones con lupus y normales sobre la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones.

Las cepas de ratones New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW) fueron compradas en The Jackson Laboratory (Maine, USA) y se cruzaron para generar la cepa de ratones lúpicos NZB x NZW F1 (BWF1). La cepa B6.Nba2 (L5), la cual contiene el locus Nba2 proveniente del cromosoma 1 de la cepa NZB inmerso en un fondo génico normal C57B16 (B6), y las diferentes cepas de ratones derivadas a partir de L5; las cepas de ratones L9, L11, L12 y L13, las cuales contienen diferentes segmentos del locus Nba2 inmersas en un fondo génico normal B6, fueron donadas por el grupo de Trine N Jorgensen de la Universidad de Colorado, USA. Las cepas de ratones Balb/c, B6 y la cruce de las cepas NZW y Balb/c (NZW x Balb/c) se utilizaron como cepas controles. 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) o en la Universidad de Virginia (Charlottesville, USA). Los animales fueron sacrificados mediante la exposición a éter etílico.

Materiales.

RPMI Medium 1640, FBS, HBSS 10X, gentamicina y 2-ME de (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), BSA, LPS y azul de tripan de (Sigma, USA), rmGM-CSF (Pharmingen, USA), Tween 20 y EDTA de (Merck, USA), ODN 1680 (CpG) y R837 de

(Invivogen, USA).

Obtención de sueros para ELISA.

Los sueros de los diferentes ratones se obtuvieron a partir de un corte sagital de vena de la cola. La sangre obtenida se dejó ON. a 4°C y la fracción líquida se recuperó y centrifugó a 1800rpm por 10 minutos a 4°C para luego recuperar el suero.

ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADN de doble hebra (ADN-dh).

El ELISA se realizó en placas de fondo plano de 96 pocillos de poliestireno (Nalge Nunc International, USA). Como antígeno se utilizaron 100µl/pozo de una solución a 31µg/ml de ADN de timo de cabra (Sigma, USA) en buffer SSC (NaCl 0,15M y citrato de Sodio 0,015M PH8). Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C y se lavaron tres veces con una solución de PBS (Na₂HPO₄ 162mM, NaH₂PO₄ 38mM, NaCl 308mM)-Tween 0,05%. Luego, las placas se bloquearon, durante 1 hora a temperatura ambiente, con PBS-BSA 1,5% y se lavaron tres veces con una solución de PBS-Tween 0,05%. Los sueros se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución de 1/500 en PBS-Tween 0,05%. Esta dilución se determinó previamente usando diferentes concentraciones del antígeno y del suero de ratones BWF1. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con una dilución de 1/2000 del anticuerpo secundario hecho en cabra anti-Ig de ratón conjugado a HRP (DAKO, USA) en PBS-Tween 0,05%. Por

último, las placas se lavaron cinco 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 50 µl de una solución de H₃P0₄ 1M (Merck, USA) y las placas se leyeron a 450nm usando un espectrofotómetro (JENWAY, UK).

Extracción de núcleos de esplenocitos.

Los esplenocitos se obtuvieron a partir del bazo de dos ratones Balb/c el cual se disecó y perfundió con 5 ml de RPMI-FBS 10%, los glóbulos rojos se lisaron con 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7.2-7.4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 1850 x g durante 5 minutos a 4°C y se transfirieron a un tubo eppendorf en el mínimo de volumen. Se determinó el volumen del precipitado y se agregaron 5 volúmenes de una solución hipotónica (HEPES 10mM PH 7,9 a 4°C, MgCl₂ 1,5mM, KCl 10mM, PMSF 0,2mM y DTT 0,5mM, estos dos últimos agregados justo antes de usar) y se centrifugaron a 1850 x g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 3 volúmenes de la solución hipotónica respecto del volumen del precipitado original y se incubó durante 10 minutos en hielo. Luego, las células se transfirieron a un homogenizador de Dounce y se maceró 10 veces vigorosamente para lisar las células. El porcentaje de lisis se evaluó mediante la tinción con azul de Tripan (0,4% p/v de azul de Tripan/PBS) antes de la lisis, el porcentaje de células muertas luego de la lisis debe ser mayor a un 80%. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 3300 x g durante 15 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió con 0,5 volúmenes del

precipitado en una solución de baja salinidad (HEPES 20mM PH 7,9 a 4°C, glicerol 25%, MgCl₂ 1,5mM, KCl 0,02M, EDTA 0,2mM, PMSF 0,2mM y DTT 0,5mM, estos dos últimos agregados justo antes de usar) y se agregaron con agitación y gota a gota el mismo volumen que en el paso anterior de una solución de alta salinidad (HEPES 20mM PH 7,9 a 4°C, glicerol 25%, MgCl₂ 1,5mM, KCl 1,2M, EDTA 0,2mM, PMSF 0,2mM y DTT 0,5mM, estos dos últimos agregados justo antes de usar) y se incubó en agitación durante 30 minutos a 4°C, al cabo de los cuales se centrifugó durante 30 minutos a 25000 x g a 4°C y se colectó el sobrenadante. Luego, los sobrenadantes se dializaron durante 1 hora a 4°C, contra 50 volúmenes de una solución de diálisis (HEPES 20mM PH 7,9 a 4°C, glicerol 20%, KCl 100mM, EDTA 0,2mM, PMSF 0,2mM y DTT 0,5mM, estos dos últimos agregados justo antes de usar). Por último, la solución dializada se centrifugó a 25000g durante 20 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante con los extractos nucleares. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford 1976) y se almacenó a -80°C.

ELISA para la detección de anticuerpos antinucleares (ANA).

El ELISA se realizó en placas de fondo plano de 96 pocillos de poliestireno (Nalge Nunc International, USA). Como antígeno se utilizaron 100µl/pozo del extracto de núcleos de esplenocitos de Balb/c diluido a una concentración de 5µg/ml en PBS, las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se bloquearon, durante 1 hora a temperatura ambiente, con PBS-BSA 1,5%. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se

incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con los sueros de los diferentes ratones a una dilución de 1/50 en PBS-Tween 0,05%. La dilución de los sueros se determinó previamente usando diferentes concentraciones del antígeno y del suero de ratones BWF1. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS + Tween 0,05% y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-ratón Ig conjugado a HRP a una dilución de 1/2000 en PBS-Tween 0,05%. Por último, las placas se lavaron cinco 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 50 µl de una solución de H₃PO₄ 1M y las placas se leyeron a 450nm usando un espectrofotómetro.

Elisa para la detección de anticuerpos anti-histonas.

El ELISA se realizó en placas de fondo plano de 96 pocillos de poliestireno (Nalge Nunc International, USA). Como antígeno se utilizaron 100µl/pozo de histonas diluido a una concentración de 50µg/ml en un tampón de Sodio Bicarbonato (NaHCO₃ 0,1M, PH 9.8), las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se bloquearon, durante 1 hora a temperatura ambiente, con PBS-BSA 1 %. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con los sueros de los diferentes ratones a una dilución de 1/100 en PBS-Tween 0,05%. La dilución de los sueros se determinó previamente usando diferentes concentraciones del antígeno y del suero de ratones L5. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS + Tween 0,05% y

se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-ratón IgG conjugado a AP (Southern Biotech, USA) a una dilución de 1/1000 en PBS-Tween 0,05%. Por último, las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100µl por pozo del sustrato para la peroxidasa diluido a 1/2000 en la solución de revelado (NaHCO_3 0.05M, 0.1g ClMg PH 9,8), la reacción se detuvo usando 50 µl de una solución de NaOH 0,2M y las placas se leyeron a 450nm usando un espectrofotómetro.

Elisa para la detección de anticuerpos anti-ADNhs.

El ELISA se realizó en placas de fondo plano de 96 pocillos de poliestireno (Nalge Nunc International, USA). Como antígeno se utilizaron 100µl/pozo de ADN de hebra simple diluido a una concentración de 50µg/ml en un tampón de Sodio Bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, PH 9.8), las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se bloquearon, durante 1 hora a temperatura ambiente, con PBS-BSA 1 %. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con los sueros de los diferentes ratones a una dilución de 1/100 en PBS-Tween 0,05%. La dilución de los sueros se determinó previamente usando diferentes concentraciones del antígeno y del suero de ratones L5. Luego, las placas se lavaron tres veces con PBS + Tween 0,05% y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-ratón IgG conjugado a AP (Southern Biotech, USA) a una dilución de 1/1000 en PBS-Tween 0,05%. Por último, las placas se

lavaron cinco veces con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100µl por pozo del sustrato para la peroxidasa diluido a 1/2000 en la solución de revelado (NaHCO₃ 0.05M, 0.1g ClMg PH 9,8), la reacción se detuvo usando 50 µl de una solución de NaOH 0,2M y las placas se leyeron a 450nm usando un espectrofotómetro.

Citometría de Flujo

Para la caracterización del fenotipo de las células dendríticas (DCs) de bazo y médula ósea, y el de las células plasmáticas en los co-cultivos de linfocitos B con DCs, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales; CD11b FITC (clon M1/70), CD19 PE Cy5.5 (clon 6D5), CD11c PE Cy7 (clon N418) de eBioscience Inc, USA; CD86 PE (clon GL-1), CD80 PE (clon 16-10A1), CD45R/B220 PE TEXAS-RED (clon RA3-6B2), I-A/I-E APC (clon M5/114.15.2), CD45R/B220 PE Cy7 (clon RA3-6B2), CD11c APC (clon N418) de Biolegend, USA y CD11c APC (clon HL3), CD138 APC (clon 281-2) de BD Bioscience Pharmingen, USA. Para determinar viabilidad se utilizó 7AAD (BD Bioscience Pharmingen, USA), PI (Sigma Aldrich, USA) y LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, USA).

Las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en HBSS-NRS 5% durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron una vez con HBSS y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en aproximadamente 300 µl de HBSS para luego ser evaluadas en un citómetro de flujo CyAn™ ADP LX de 9 colores (DAKO, USA), o en

un FACScan (BD Bioscience, USA). Los análisis de los datos se hicieron utilizando los software Flowjo (Tree star, USA).

Generación de células dendríticas de médula ósea (BMDCs).

La tibia y el fémur de los diferentes ratones se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente en ETOH 70%. Las extremidades de los huesos se cortaron en pequeños pedazos para obtener los precursores contenidos en ellas y los huesos se perfundieron con 10ml de RPMI. Posteriormente, los glóbulos rojos se lisaron en 1ml 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) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las células se resuspendieron a 1×10^6 células/ml de medio de diferenciación (RPMI, FBS 10%, 2-ME 50 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y rmGM-CSF 10ng/ml) y se cultivaron durante 5 días en una placa de 24 pocillos (Nalge Nunc International, USA) en un volumen de 1 ml de medio de cultivo. Durante los días 2 y 4 del cultivo se realizó un cambio de medio, reemplazando 800 μl del medio antiguo por un 1 ml de medio fresco con las concentraciones de rmGM-CSF originales. Al día 5 de cultivo las células se recuperaron y se lavaron una vez con una solución T-MACS (PBS, EDTA 2mM, FBS 5%) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C con agitación con 30 μl de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec, Alemania) por cada 1×10^8 de células totales en 300 μl de T-MACS. En seguida, las células se lavaron una vez con 10ml de T-MACS, se resuspendieron a 1×10^8 células/ml en T-MACS y se seleccionaron

positivamente usando un magneto (VarioMACS) y columnas LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). Se colectó la fracción positiva la cual contiene las DCs.

Activación de las BMDCs.

Las BMDCs se cultivaron a una concentración de 4×10^6 células/ml en 200µl de RPMI-FBS 10% en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, en presencia de 100ng/ml de LPS o 10µg/ml de CpG (ODN 1680) durante 24 horas. Se determinó la secreción de la citoquina IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos mediante ELISA de captura.

ELISA de captura para las citoquinas IL-10 e IL-6.

Para la determinación de IL-10 se utilizó el kit Duo Set mouse IL-10 (R&D Systems, USA) o el kit mouse IL-10 ELISA Set (BD Bioscience, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la determinación de IL-6, se utilizó 100µl del anticuerpo anti-IL-6 de ratón (clon MP5-20F3) (eBioscience, USA) a 2µg/ml diluido en PBS para cubrir las placas de 96 pocillos de fondo plano de alta afinidad (Corning Costar, USA), las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente, con PBS-BSA 1%. Los sobrenadantes a evaluar se agregaron sin diluir y se

incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Luego las placas se lavaron cinco veces con PBS-Tween 0,05% y se agregó a una dilución de 1/1000 el anticuerpo anti-ratón IL-6 biotina (clon MP5-32C11) (eBioscience, USA). Como referencia se utilizó una dilución seriada de la citoquina recombinante murina IL-6 (Peprotech Inc, USA) partiendo de 2000pg/ml. Todos los ELISA se revelaron usando el kit TMB Substrate Reagent Set (BD Bioscience, USA), la reacción se detuvo usando 50µl H₃P0₄ 1M y las placas se leyeron a 450nm usando un espectrofotómetro.

Purificación de las células dendríticas (DCs) de bazo.

El bazo de los diferentes ratones se disgregó mecánicamente y se resuspendió en 4,5ml de RPMI-FBS 10%. Las células se digirieron en presencia de 1mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20µg/ml de DNAsa (Sigma, USA), durante 1 hora a 37°C en rotación. Posteriormente, las células se pasaron a través de un tamiz metálico de 90µm y los glóbulos rojos se lisaron en 1ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron una vez con 10ml de T-MACS (PBS, EDTA 2mM, FBS 5%) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C con agitación con 50µl de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec, Alemania) por cada 1x10⁸ de células totales en 300µl de T-MACS. En seguida, las células se lavaron una vez con 10ml de T-MACS, se resuspendieron a 1x10⁸ células/ml en T-MACS y se seleccionaron positivamente usando un magneto (VarioMACS) y

columnas LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania).

Se colectó la fracción positiva la cual contiene las DCs.

Purificación de las DCs de bazo mediante *cell sorting*.

Se realizó un enriquecimiento de las DCs de bazo de acuerdo al protocolo previamente descrito para la purificación de DCs de bazo con perlas magnéticas. Las DCs enriquecidas, se marcaron durante 20 minutos a 4°C en HBSS-NRS 5% con diferentes combinaciones de anticuerpos dependiendo de la subpoblación de DCs a seleccionar. Las células se lavaron una vez con HBSS y se resuspendieron a 20×10^6 células/ml en HBSS y se agregó 0,5µg/ml de DAPI (Invitrogen, USA) para determinar viabilidad. La separación celular se realizó usando un DIVA FACSVantage SE TurboSort™ (Becton Dickinson, USA) en la Universidad de Virginia.

Activación de las DCs de bazo.

Las DCs se cultivaron durante 24 horas a una concentración de 4×10^6 células/ml, a menos que se indique lo contrario, en 200µl de RPMI-FBS 10% en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, en presencia de 100ng/ml de LPS, 10µg/ml de CpG (ODN 1680) o 10µg/ml de R837. Se determinó la secreción de las citoquinas IL-10 e IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos mediante ELISA de captura.

Tinción de GIEMSA.

Las DCs de bazo (CD11c⁺ CD19⁻ y CD11c⁺ CD19⁺) y los linfocitos B (CD11c⁻ B220⁺) se purificaron por *cell sorting* en base a la expresión de CD11c y CD19. Las células se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en 200µl de PBS y se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga para portaobjetos (Cytospin 2, Shaddon). Los portaobjetos con las células se secaron al aire durante 15 minutos y se fijaron en metanol 95% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego los portaobjetos se tiñeron con una solución de Giemsa (Sigma, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces en PBS y se montaron en una solución de montaje. Todas las imágenes se tomaron con una magnificación de 40x.

Co-cultivo de linfocitos B con DCs de bazo.

Las DCs de bazo CD11c⁺ de ratones B6 o L5 se aislaron de acuerdo al protocolo de purificación de células dendríticas de bazo por *cell sorting*. Los linfocitos B (LB) se purificaron a partir del bazo de ratones B6. Los glóbulos rojos se lisaron por incubación 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) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron una vez con RPMI-FBS 10% y los linfocitos T se eliminaron mediante lisis con complemento. Para esto, las células se resuspendieron en 10 ml de RPMI-FCS 5% y se agregaron 200µl del anticuerpo HO.314 (anti-Thy1.1) en

agitación a 4°C durante 30 minutos. En seguida, las células se lavaron una vez con RPMI-FCS 5% y se incubaron en 10 ml de RPMI-FCS 10% + 300 µl de complemento de conejo durante 45 minutos a 37°C en el baño termorregulador. Las DCs ($0,05 \times 10^6$ células/pocillo) y los linfocitos B ($0,1 \times 10^6$ células/pocillo) se co-cultivaron durante 6 días en una placa de 96 pocillos en 200 µl de medio de cultivo completo (cRPMI) (RPMI, FBS 10%, 2ME 50µM, HEPES 100mM, Piruvato de Sodio 10mM), en presencia o ausencia de 10µg/ml de CpG (ODN 1628). Al día 6 de co-cultivo, se determinó la capacidad las DCs de inducir la diferenciación de linfocitos B ($B220^+ CD138^-$) a células plasmáticas ($B220^+ CD138^+$) mediante citometría de flujo. Para determinar el incremento de células plasmáticas debido a los diferentes tratamientos se calculó la razón entre el número de células plasmáticas en cada tratamiento dividido por el número de células plasmáticas en los linfocitos B no tratados.

Análisis Estadístico.

A menos que se indique lo contrario los análisis estadísticos se realizaron usando el test T de Student pareado con dos colas. En el caso del análisis del incremento del porcentaje de células plasmáticas se utilizó el test de ANOVA no pareado (el análisis de varianza en un sentido con test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0,05$. Para los análisis estadísticos y la confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad PRISM 4 (GraphPad Software, Inc., USA).

RESULTADOS

Los ratones lúpicos presentan niveles elevados de auto-anticuerpos en el suero, los cuales se correlacionan con la presencia de la región central del locus Nba2.

El modelo murino de lupus BWF1, es uno de los modelos que más se asemeja a la enfermedad en humanos. En este modelo las hembras desarrollan, a partir de dos meses, niveles elevados de auto-anticuerpos específicos contra antígenos nucleares (ANA) y a partir de los 5 meses, una glomerulonefritis la cual se manifiesta con el desarrollo de proteinuria. Dentro de los ANA, los auto-anticuerpos específicos para el ADN de doble hebra (ADN-dh) se correlacionan con la actividad de la enfermedad en humanos (ter Borg, Horst et al. 1990). Al evaluar los niveles de auto-anticuerpos en el suero de los ratones encontramos que ratones BWF1 presentan niveles séricos elevados de ANA y de auto-anticuerpos contra ADN-dh comparado con ratones normales NZWxBalb/c F1 de igual sexo y edad (Figura 2A y 2B), esto determinado por una mayor absorvancia a 450nm en el ELISA. En todos los experimentos realizados en este modelo se utilizaron ratones hembras mayores de 5 meses y que presentaban proteinuria.

El modelo murino B6.Nba2 contiene el locus de susceptibilidad Nba2 (*New Zealand Black autoimmunity 2*) en un fondo génico normal B6. El locus Nba2 es una región génica derivada del cromosoma 1 de la cepa parental NZB. En este trabajo se utilizaron diferentes cepas congénicas al modelo B6.Nba2, en las cuales distintos segmentos del locus Nba2 se introdujeron en un fondo génico normal C57-BI6 (B6).

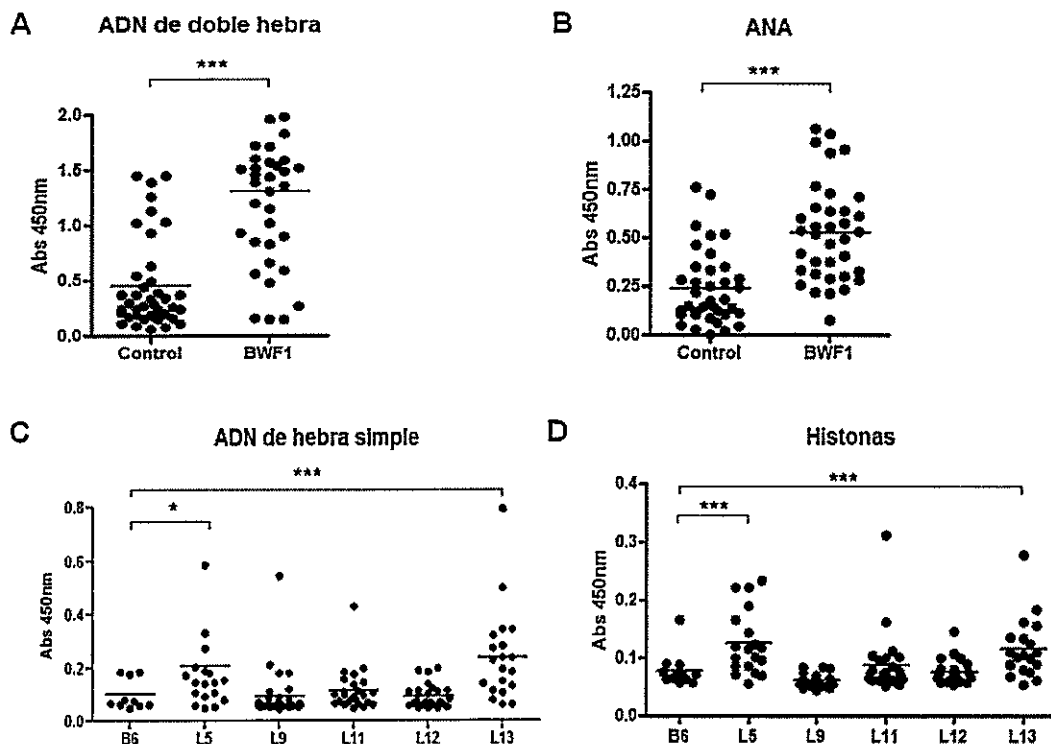


Figura 2. Los ratones con susceptibilidad al lupus BWF1, L5 y L13 desarrollan altos niveles de auto-anticuerpos en el suero comparado con ratones normales B6 o NZWxBalb/c F1. Se determinaron los niveles de secreción de diferentes auto-anticuerpos característicos del lupus. (A) Elisa de anticuerpos anti-ADN de doble hebra en ratones normales NZWxBalb/c y lúpicos BWF1. Los sueros se utilizaron a una dilución de 1/500. (B) Elisa de anticuerpos anti-antígenos nucleares (ANA) en ratones normales NZWxBalb/c y en ratones lúpicos BWF1. Los sueros se utilizaron a una dilución de 1/50. (C) Elisa de anticuerpos anti-ADN de hebra simple en ratones normales B6 y lúpicos L5, L9, L11, L12 y L13. Los sueros se utilizaron a una dilución de (D) Elisa de anticuerpos anti-histonas en ratones normales B6 y lúpicos L5, L9, L11, L12 y L13. Los sueros se utilizaron a una dilución de . Cada punto representa un ratón diferente. El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

Las diferentes cepas congénicas a Nba2 se denominaron como L5, L9, L11, L12 y L13 (Figura 1), dentro de los cuales L5 contiene el locus Nba2 completo. Todos los experimentos se realizaron con ratones hembras mayores de 4 meses. Al evaluar los niveles de auto-anticuerpos en este modelo, se encontró que los ratones L5, que contienen el locus Nba2 completo y L13 que posee un segmento central de esta región (ver Figura 1), poseen altos niveles séricos de ANA, específicos contra el ADN de hebra simple y contra histonas (Figura 2C y 2D). Estos resultados correlacionan los niveles elevados de auto-anticuerpos presentes en el suero de los ratones B6.Nba2, a la región central del locus Nba2, correspondiente a los genes presentes en los ratones L13.

Las BMDCs de ratones lúpicos presentan un fenotipo similar al de BMDCs de ratones normales y no muestran diferencias en su capacidad de secreción de IL-10 en respuesta a LPS o CpG.

Se caracterizaron las DCs generadas a partir de precursores de médula ósea (BMDCs). Al evaluar el número de células presentes en la médula ósea de la tibia y el fémur de los diferentes ratones (n=10 por grupo) se encontró que los ratones con lupus BWF1 poseen un menor número de células en la médulas ósea (Tabla 1) comparado con la médula ósea de ratones normales NZW x Balb/c F1.

Tabla 1: Número de células en la médula ósea.

Ratones	Nº de células
NZW x Balb/c	33,61 ± 13,10
BWF1	20,15 ± 9,142*

El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student. * $p < 0,05$.
n=10.

Para evaluar el fenotipo de las BMDCs de los diferentes ratones (n=3 por grupo), se determinó la expresión de dos marcadores de maduración de las DCs CD86 y las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Se encontró que el fenotipo de las BMDCs provenientes de los ratones con lupus BWF1 y L5 es similar al de las BMDCs proveniente de ratones normales (B6 o NZW x Balb/c F1) (Figura 3A y B).

A continuación, se evaluó la capacidad de las BMDCs provenientes de los diferentes ratones de secretar IL-10 en respuesta a estímulos bacterianos puros. Para esto las BMDCs se activaron por 24 horas en presencia de LPS o CpG, los cuales activan TLR-4 y TLR-9 respectivamente. Se encontró que la secreción de IL-10 en respuesta a LPS o CpG es similar entre las BMDCs provenientes de ratones lúpicos y las BMDCs provenientes de ratones normales (Figura 4A y B). En conclusión, estos resultados muestran que no existen diferencias significativas entre las DCs generadas a partir de precursores de médula ósea de ratones lúpicos y normales respecto del fenotipo y de la secreción de IL-10 en respuesta a estímulos patógenicos.

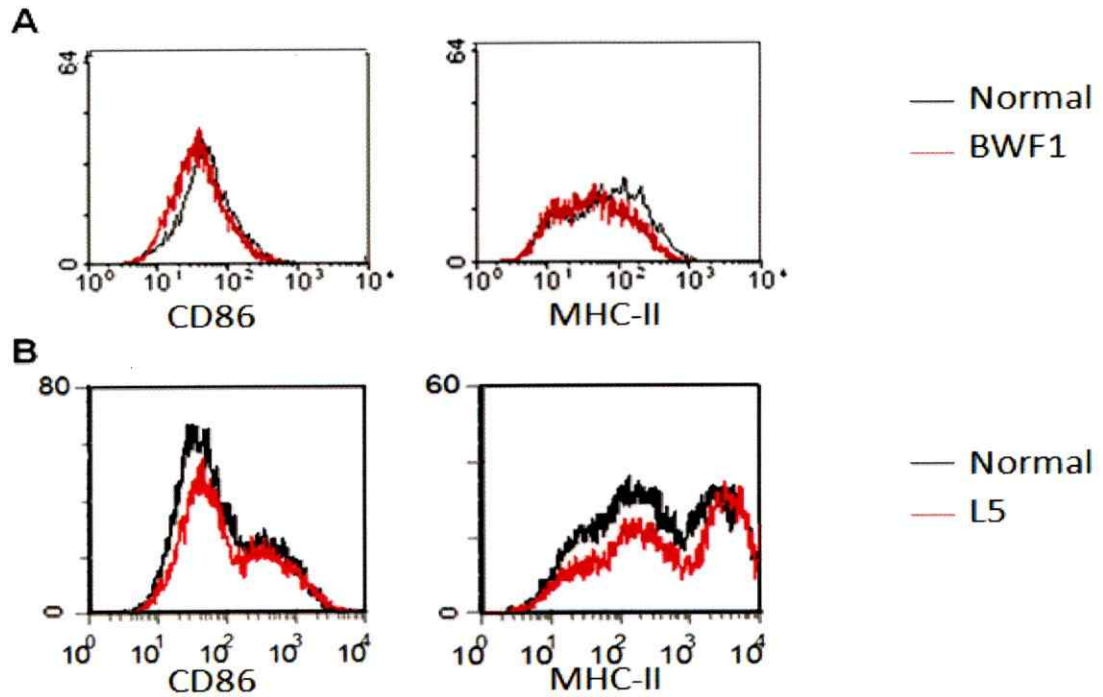


Figura 3. El fenotipo de las BMDCs generadas a partir de precursores de médula ósea de ratones con lupus es similar al de las BMDCs generadas de precursores de médula ósea normales. Las BMDCs se generaron de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. Las BMDCs se marcaron con los anticuerpos para CD11c, CD86 y MHC-II y la intensidad media de fluorescencia (IFM) se evaluó mediante citometría de flujo. (A) IFM para MHC-II y CD86 en DCs de ratones BWF1 y normales. (B) IFM MHC-II y CD86 en ratones L5 y normales. Los gráficos representan un experimento representativo de tres. El análisis estadístico se realizó mediante el test T de Student.

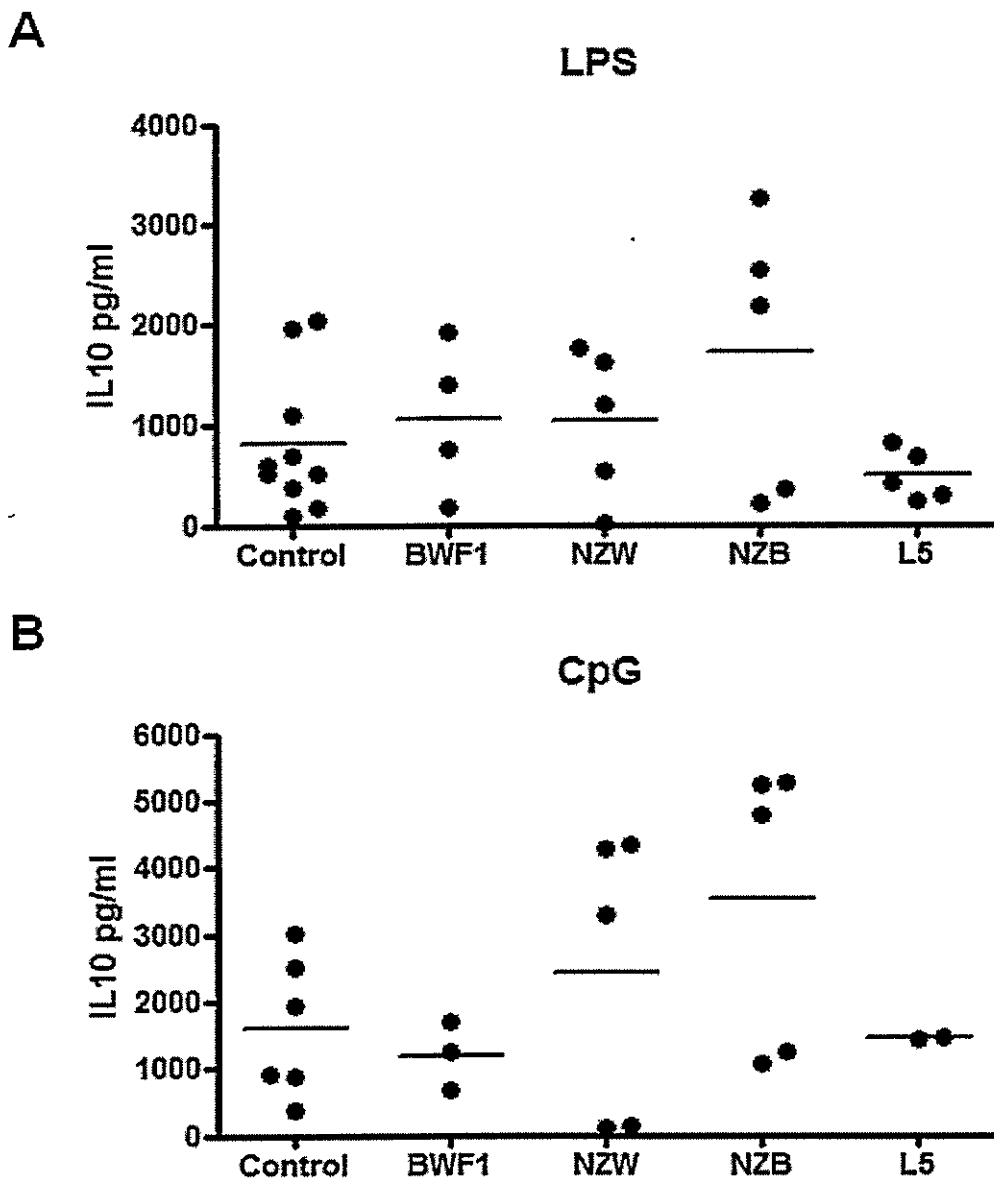


Figura 4: Las BMDCs de ratones con lupus secretan similares niveles de IL-10 en respuesta a LPS y CpG comparadas con BMDCs de ratones controles. BMDCs de los diferentes ratones con lupus (BWF1, L5), de las cepas parentales (NZB y NZW) y de los ratones control (B6), se generaron de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. (A) BMDCs se cultivaron a 4×10^6 células/ml en presencia de 100ng/ml de LPS durante 24 horas. (B) BMDCs se cultivaron a 4×10^6 células/ml en presencia de 10 μ g/ml de CpG durante 24 horas. En ambos casos la secreción de IL-10 se determinó en los sobrenadantes de los cultivos mediante un ELISA de captura. Cada punto representa un ratón independiente. El análisis estadístico se realizó mediante el test T de Student y ANOVA y las diferencias no fueron significativas.

El bazo de ratones lúpicos posee un mayor porcentaje de pDCs y un mayor número absoluto de cDCs y de pDCs comparado con el bazo de ratones normales.

Las DCs de bazo se dividen principalmente en dos subpoblaciones, las DCs convencionales (cDC), las cuales son CD11c+ CD11b+ B220- y las DCs plasmacitoides (pDC) CD11c+ CD11b- B220+. Se evaluó el número absoluto de cDCs y pDCs en el bazo de los diferentes ratones. Encontramos que el bazo de los ratones lúpicos BWF1, L5, L12 y L13 presentan un mayor número absoluto de DCs CD11c+ B220+ (pDCs) (Figura 5A) y de DCs CD11c+ B220- (cDCs) (Figura 5B) comparadas con el bazo de ratones controles B6. El bazo de ratones lúpicos L11 sólo muestra diferencias significativas en el número absoluto de las pDCs, mientras que el bazo de los ratones lúpicos L9 no muestra diferencias significativas en ninguna de las dos subpoblaciones comparadas con el bazo de ratones controles.

Luego evaluamos el porcentaje de pDCs y cDCs en el bazo de los diferentes ratones. Encontramos que los ratones lúpicos BWF1, L5, L11, L12 y L13 poseen un mayor porcentaje de pDCs (Figura 5C) comparado con el bazo de ratones normales y que sólo el bazo de los ratones L9 no muestra diferencias significativas en el porcentaje de pDCs con respecto al bazo de ratones normales. Por el contrario, al evaluar el porcentaje de cDCs, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de estas DCs en el bazo de ratones lúpicos comparado con el bazo de ratones normales (Figura 5D). Estos resultados muestran una alteración en la diferenciación o en el mantenimiento de las DCs en el bazo de ratones lúpicos, principalmente en las pDCs.

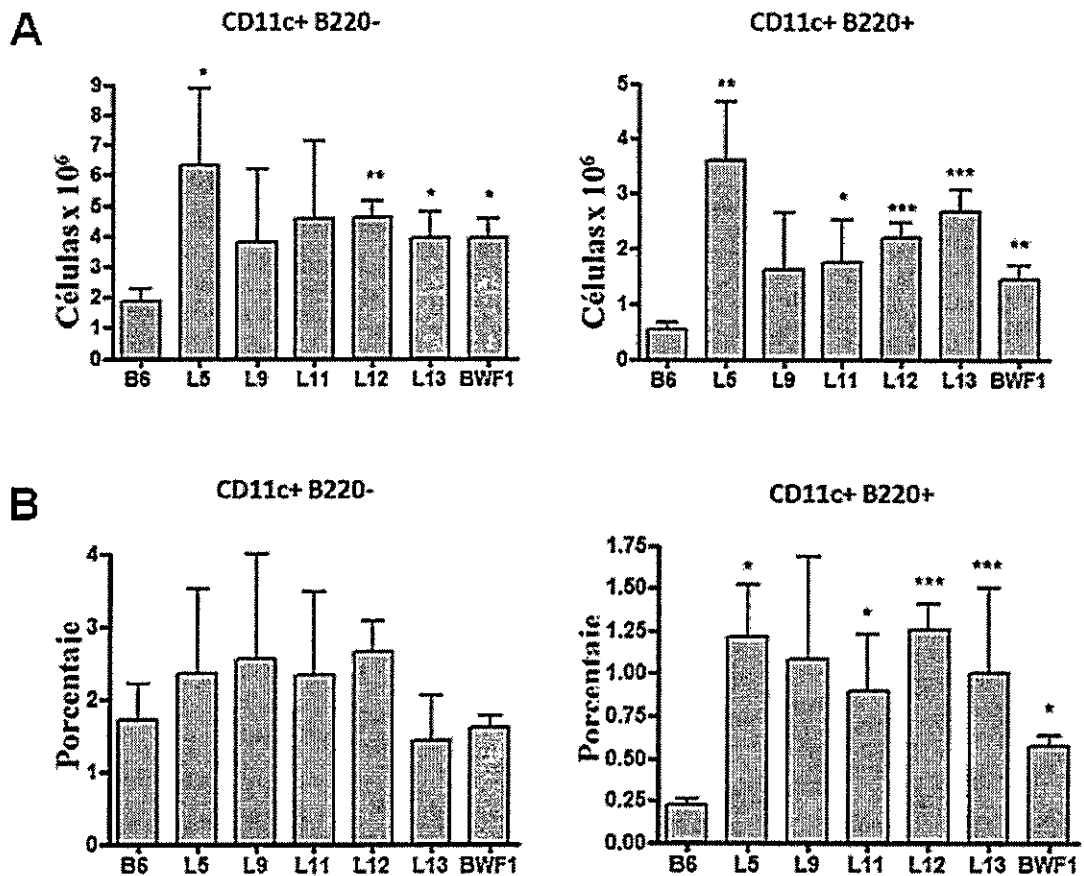


Figura 5. El bazo de ratones con lupus posee un mayor porcentaje de pDCs ($CD11c^+ B220^+$) y un mayor número absoluto de pDCs y cDCs ($CD11c^+ B220^-$). DCs de bazo de ratones normales (B6) y de las diferentes cepas de ratones lúpicos (L5, L9, L11, L12, L13 y BWF1) se purificaron de acuerdo protocolo descrito en materiales y métodos. Las DCs de bazo se marcaron con una combinación de anticuerpos para CD11c y B220 y se determinó, mediante citometría de flujo, el número absoluto (A) y el porcentaje (B) de las DCs convencionales ($CD11c^+ B220^-$) y las DCs plasmacitoides ($CD11c^+ B220^+$). El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student, con un $n=3$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Las DCs de bazo de ratones lúpicos presentan una alteración en la expresión de CD86 y MHC-II comparadas con DCs de bazo de ratones normales.

Luego de evaluar la frecuencia de las dos principales subpoblaciones de DCs del bazo (pDCs y cDCs) se evaluó su fenotipo, para esto se determinó la expresión de dos marcadores de maduración CD86 y MHC-II. Se encontró que las pDCs de ratones lúpicos poseen una menor expresión de CD86 (Figura 6A) y una mayor expresión de MHC-II (Figura 6B) comparadas con pDCs de ratones normales. Además, se encontró que las cDC de los ratones lúpicos no muestran diferencias en la expresión de CD86 (Figura 7A) y que las cDCs de los ratones lúpicos BWF1, L9 y L13 poseen una menor expresión de MHC-II comparadas cDCs de ratones normales (Figura 7B). Estos resultados muestran que ambas subpoblaciones de DCs del bazo de ratones lúpicos poseen una alteración en el fenotipo, aunque este defecto es más evidente en las pDCs.

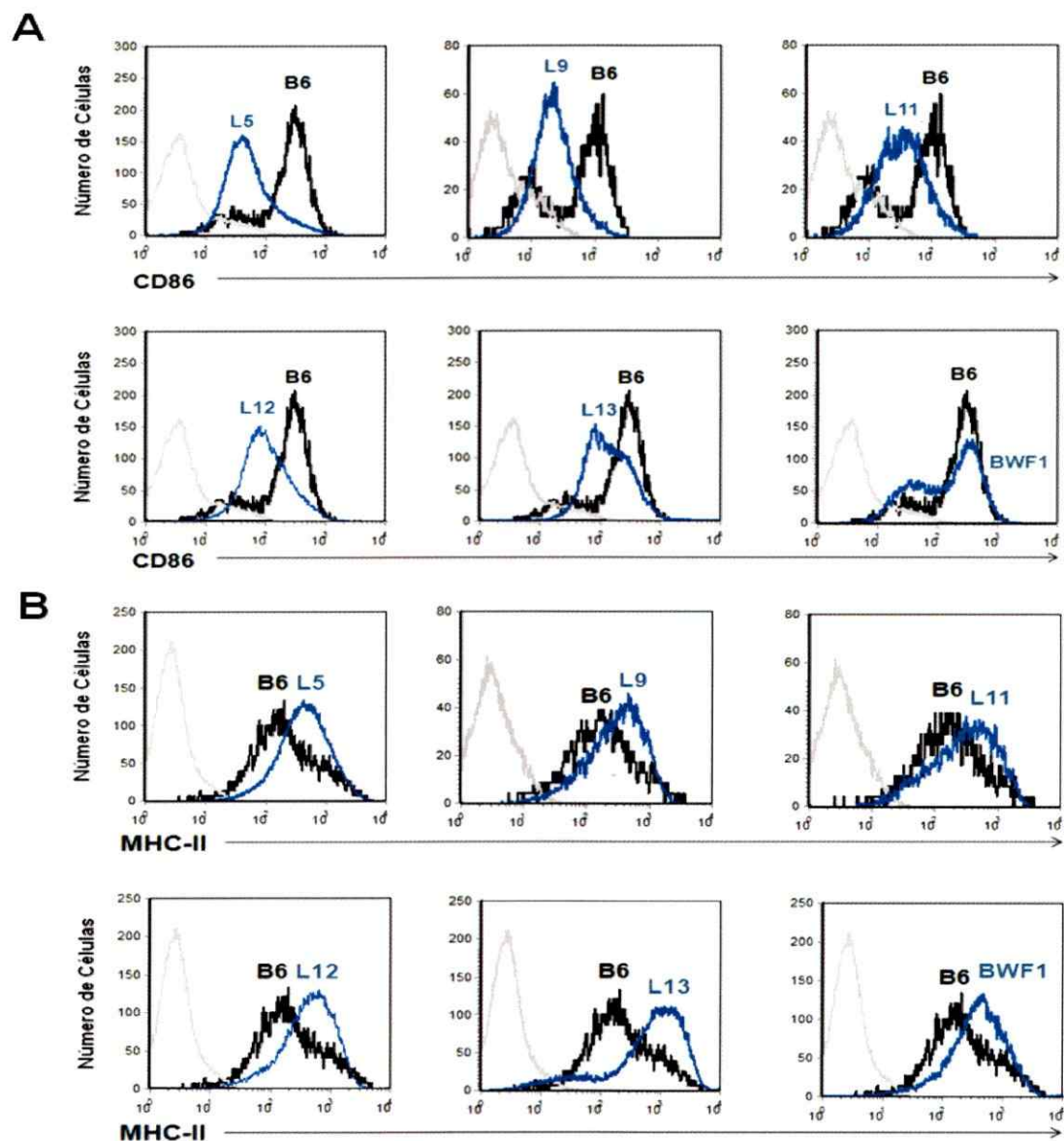


Figura 6. Las pDCs de ratones lúpicos presentan una menor expresión de CD86 y una mayor expresión de MHC-II comparadas con pDCs de ratones normales. DCs de bazo de ratones normales (B6) y de las diferentes cepas de ratones lúpicos (L5, L9, L11, L12, L13 y BWF1) se purificaron por MACS de acuerdo protocolo descrito en materiales y métodos. Las DCs de bazo se marcaron para CD11c, B220, CD86 y MHC-II, la expresión de los diferentes marcadores se determinó mediante citometría de flujo. (A) Expresión de CD86 en las pDCs de ratones normales (negro) y de los diferentes ratones lúpicos (azul). B) Expresión de MHC-II en las pDCs de ratones normales (negro) y de los diferentes ratones lúpicos (azul). En gris se muestra el control de isotipo. El gráfico muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

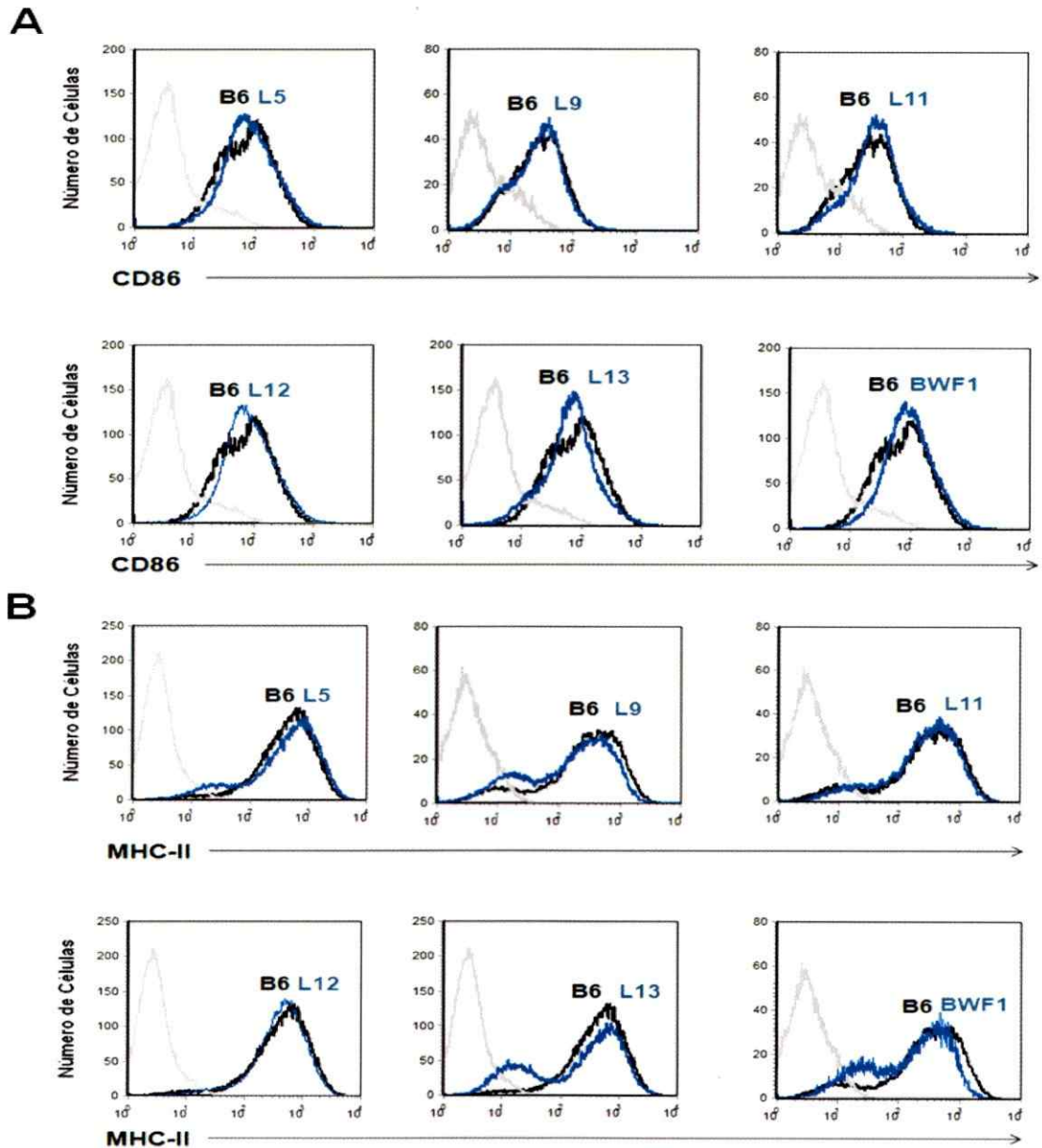


Figura 7. Las cDCs de ratones L9, L13 y BWF1 expresan menos MHC-II comparadas con las cDCs de ratones normales. DCs de bazo de ratones normales (B6) y de las diferentes cepas de ratones lúpicos (L5, L9, L11, L12, L13 y BWF1) se purificaron por MACS de acuerdo protocolo descrito en materiales y métodos. Las DCs de bazo se marcaron para CD11c, B220, CD86 y MHC-II. La expresión de los diferentes marcadores de superficie se determinó mediante citometría de flujo. (A) Expresión de CD86 en las cDCs de ratones normales (negro) y de los diferentes ratones lúpicos (azul). B) Expresión de MHC-II en las cDCs de ratones normales (negro) y de los diferentes ratones lúpicos (azul). En gris se muestra el control de isotipo. El gráfico muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan mayores niveles de IL-10 comparadas con DCs de bazo de ratones normales en respuesta a LPS o CpG, lo cual se correlaciona con la presencia de la región central del locus Nba2.

Luego de comprobar que ambas subpoblaciones de DCs presentan un defecto en la expresión de marcadores de maduración se evaluó la funcionalidad de las estos. Para esto se determinó la secreción de la citoquina IL-10 en respuesta a dos estímulos patogénicos puros: LPS que activa el TLR-4 y CpG que activa el TLR-9. Se encontró que las DCs de bazo de ratones lúpicos BWF1, L5 y L13 y la cepa parental NZB secretan mayores niveles de IL-10, en respuesta a LPS, comparadas con DCs de ratones normales (Figura 8A) y que en respuesta a CpG, las DCs de los ratones lúpicos BWF1, L5 y L13 y las cepas parentales NZB y NZW secretan mayores niveles de IL-10 comparadas con las DCs de ratones normales (Figura 8B). Estos resultados nos permiten restringir las alteraciones en la secreción de IL-10 de las DCs de ratones lúpicos a la presencia de la región central del locus Nba2, la cual está presente en la cepa de ratones L13.

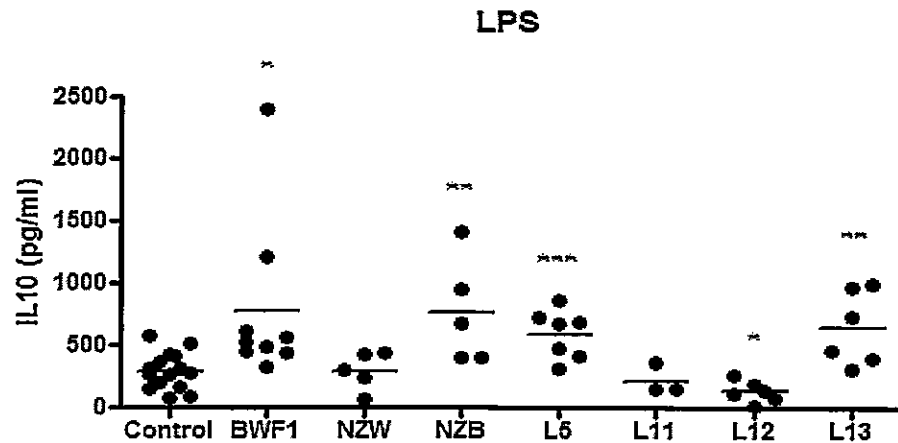
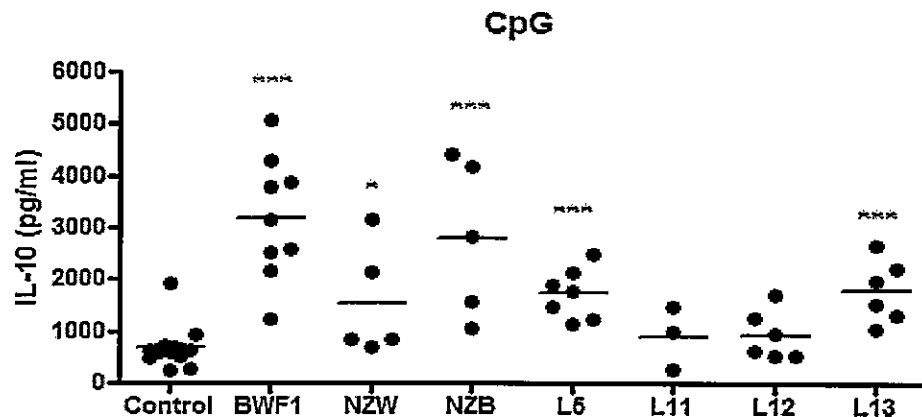
A**B**

Figura 8: Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a estímulos TLR comparadas con DCs de bazo de ratones normales, lo cual se restringe a la presencia del segmento central del locus *Nba2*. Las DCs de bazo de ratones con lúpicos (BWF1, L5, L8, L11, L12 y L13), de las cepas parentales (NZB y NZW) y de los ratones normales (B6), se purificaron por MACS de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. (A) DCs de bazo se cultivaron a 4×10^6 células/ml en presencia de 100ng/ml de LPS durante 24 horas. (B) DCs de bazo se cultivaron a 4×10^6 células/ml en presencia de 10 μ g/ml de CpG durante 24 horas. La secreción de IL-10 en los sobrenadantes se determinó mediante un ELISA de captura. Cada punto representa un ratón independiente. El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan niveles similares de IL-6 en respuesta a LPS o CpG comparadas con DCs de bazo de ratones normales.

IL-6 es otra citoquina que ha sido vinculada con la patogénesis del lupus. Se evaluó la secreción de IL-6 en respuesta a diferentes estímulos patogénicos puros: LPS o CpG. Se encontró que sólo los ratones lúpicos L12 secretan menores niveles de IL-6 en respuesta a LPS comparado con ratones normales B6 (Figura 9A), sin embargo no encontramos diferencias en la secreción IL-6 por parte de las DCs de bazo de ratones lúpicos en respuesta a CpG comparadas con las DCs de ratones normales (Figura 9B). Estos resultados sugieren que la secreción de IL-6 por parte de las DCs de bazo no estaría influenciada por los genes pertenecientes al locus Nba2.

Las DCs de bazo de ratones L5 purificadas por *cell sorting* secretan mayores niveles de IL-10, en respuesta a CpG, comparadas con DCs de bazo de ratones normales.

Las DCs de bazo purificadas por MACS anti-CD11c alcanzaron una pureza de aproximadamente 60-70%, por lo que quisimos comprobar si DCs purificadas a través de un *cell sorter*, donde la pureza de las células supera el 95%, muestran diferencias en la secreción de IL-10 en respuesta a tres ligandos de TLR: LPS (ligando de TLR-4), CpG (ligando de TLR-9) y R837 (ligando de TLR-7). Se encontró que las DCs CD11c+ de los ratones lúpicos L5 con un nivel de pureza del 95%, secretan mayores niveles de IL-10 sólo en respuesta a CpG (Figura 10B). Respecto de la secreción de IL-6 no se

encontraron diferencias en la secreción de IL-6 en respuesta a los estímulos bacterianos puros, sin embargo se encontró una diferencia significativa en las DCs no estimuladas, en donde las DCs de bazo de ratones lúpicos L5 secretan mayores niveles de IL-6 comparada con las DCs de ratones normales, aunque la secreción es baja comparada con la secreción en respuesta a los estímulos bacterianos puros. En resumen las DCs de bazo lúpicas secretan mayores niveles de IL-10 solo en respuesta a CpG.

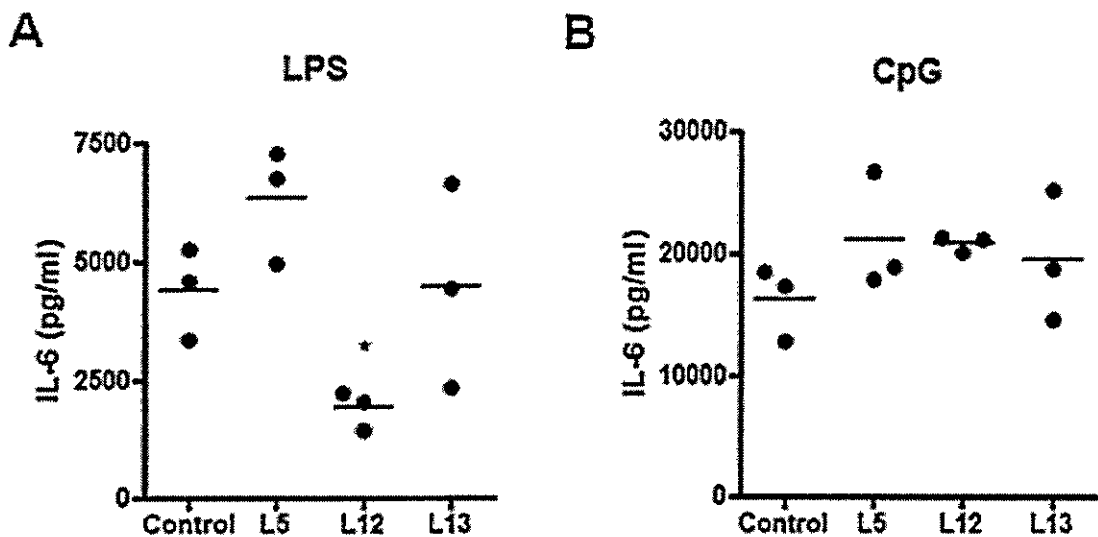


Figura 9: Las DCs de bazo de ratones lúpicos secretan similares niveles de IL-6 en respuesta a estímulos TLR comparadas con DCs de bazo de ratones normales. Las DCs de bazo de ratones normales (B6) y de los diferentes ratones lúpicos (L5, L12 y L13) se purificaron por MACS de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. (A) Las DCs de bazo se cultivaron a 4×10^6 células/ml en presencia de 100ng/ml de LPS durante 24 horas. (B) Las DCs de bazo se cultivaron a 4×10^6 células/ml en presencia de 10 μ g/ml de CpG durante 24 horas. La secreción de IL-6 se determino en los sobrenadantes mediante un ELISA de captura. El análisis estadísticos se realizó mediante un test T de Student, * $p < 0,05$.

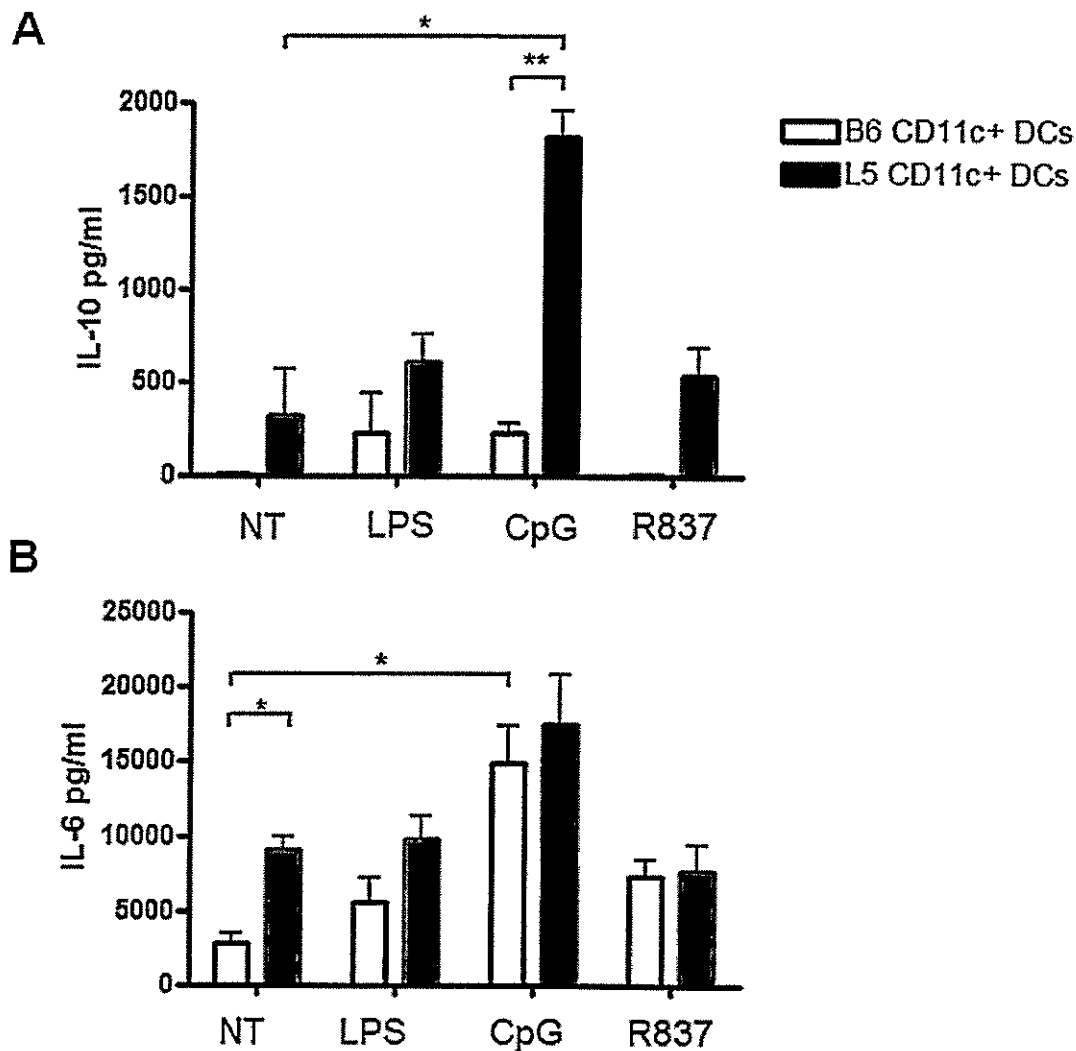


Figura 10: DCs de bazo de ratones L5 purificadas por *cell sorting* secretan mayores niveles de IL-10 en comparación con DCs de bazo de ratones normales solo en respuesta a CpG. Las DCs de bazo de los ratones lúpicos (L5) y normales (B6) se purificaron por *cell sorter* en base a la expresión de CD11c, de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. (A) Las DCs de bazo se cultivaron a 1×10^6 células/ml en presencia o ausencia de 100ng/ml de LPS, 10 μ g/ml de CpG o 10 μ g/ml de R837 durante 24 horas. (B) Las DCs de bazo se cultivaron a 1×10^6 células/ml en presencia o ausencia de 100ng/ml de LPS, 10 μ g/ml de CpG o 10 μ g/ml de R837 durante 24 horas. La presencia de IL-10 e IL-6 en el sobrenadante se determinó mediante un ELISA de captura. El análisis estadísticos se realizó mediante un test T de Student, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

El bazo de los ratones lúpicos posee un mayor porcentaje y número absoluto de la subpoblación de DCs CD19+.

En la literatura se ha descrito una nueva subpoblación de DCs las cuales poseen la capacidad de inhibir la proliferación y activación de linfocitos T. Estas DCs se describen como una población minoritaria en el bazo de ratones normales, las cuales expresan los marcadores CD11c, B220 y CD19 (Baban, Hansen et al. 2005; Mellor, Baban et al. 2005). En el presente trabajo se evaluó la frecuencia y el número de estas DCs en el bazo de los diferentes ratones. Se encontró que el bazo de ratones lúpicos BWF1, L5, L9, L11, L12 y L13, presentan un mayor porcentaje de DCs CD19+ B220+ comparadas con los bazos de los ratones normales B6 (Figura 11A y B). Al analizar los números absolutos de DCs CD19+, el bazo de los ratones lúpicos L5, L9, L11 y L12 posee un mayor número absolutos de estas DCs comparado con el bazo de ratones normales B6 (Figura 11C). Por último se encontró que la presencia de estas DCs se relaciona con la edad de los ratones, ya que el bazo de ratones lúpicos L5 jóvenes no muestran diferencias en el porcentaje de DCs CD19+ B220+ comparadas con los bazos de los ratones normales de la misma edad (Figura 11D), mientras que los ratones lúpicos poseen un incremento de DCs CD19+ y B220+ cuando los ratones aumentan su edad.

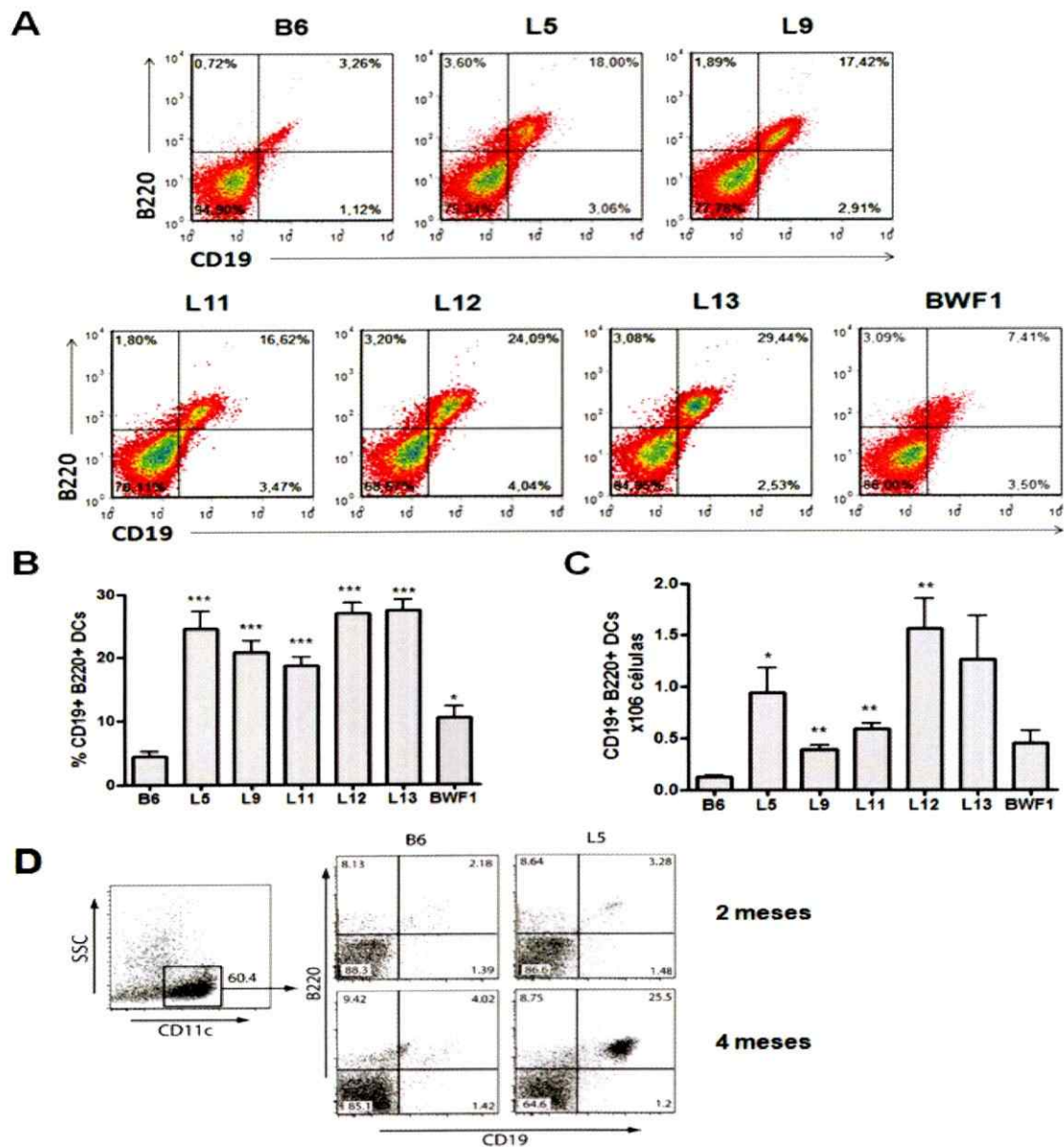


Figura 11. Los ratones con susceptibilidad al lupus poseen un mayor porcentaje y número de DCs CD19⁺ B220⁺, incremento que depende de la edad del ratón. DCs de bazo de ratones normales (B6) y de las diferentes cepas de ratones con susceptibilidad al lupus (L5, L9, L11, L12, L13 y BWF1) se purificaron por MACS de acuerdo protocolo descrito en materiales y métodos. Las DCs de bazo se marcaron para CD11c, B220 y CD19. (A) Expresión de CD19 y B220 en las DCs CD11c⁺. (B) Porcentaje de DCs CD19⁺ B220⁺ CD11c⁺ diferentes cepas de ratones. (C) Número absoluto de DCs CD19⁺ B220⁺ CD11c⁺ en diferentes cepas de ratones. (D) Comparación del porcentaje de DCs CD19⁺ B220⁺ CD11c⁺ entre ratones de 2 meses y 4 meses. El análisis estadístico se realizó mediante el test T de Student. *p < 0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001.

Las DCs de bazo CD19⁺ y CD19⁻ de ratones lúpicos secretan niveles elevados similares de IL-10 en respuesta a CpG.

Luego de comprobar que además de las clásicas subpoblaciones de DCs de bazo (pDC y cDCs), los ratones lúpicos presentan un aumento de otra subpoblación de DCs del bazo, la cual se ha descrito como minoritaria en ratones normales, verificamos que efectivamente estas células CD11c⁺ CD19⁺ presentan la típica morfología de DCs. Para esto se realizó una tinción de Giemsa y luego se analizaron las muestras bajo el microscopio de luz. Se encontró que las DCs CD11c⁺ CD19⁺ poseen las típicas dendritas características de su morfología (Figura 12A, flechas) a diferencia de los linfocitos B, los cuales también expresan CD19 pero son negativos para CD11c. Luego se evaluó si esta subpoblación es la responsable de secretar niveles elevados de IL-10 en respuesta a CpG. Para esto se determinó la secreción de IL-10 en respuesta a los diferentes estímulos patogénicos puros en las DCs purificadas por *cell sorting* en base a la expresión de CD11c y CD19. Se encontró que tanto las DCs CD19⁺ y CD19⁻ son capaces de producir IL-10 en respuesta a CpG y que no existen diferencias significativas entre ambas subpoblaciones en su capacidad de secretar esta citoquina (Figura 12B).

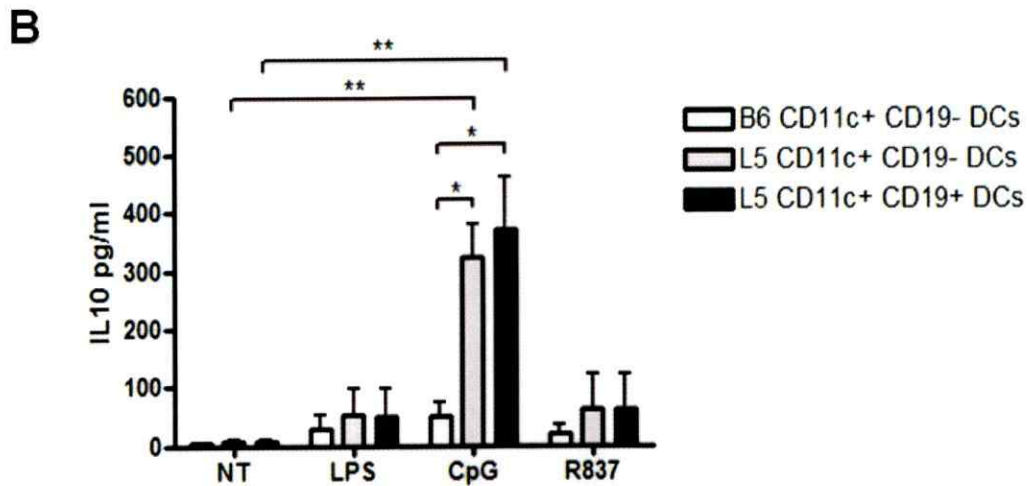
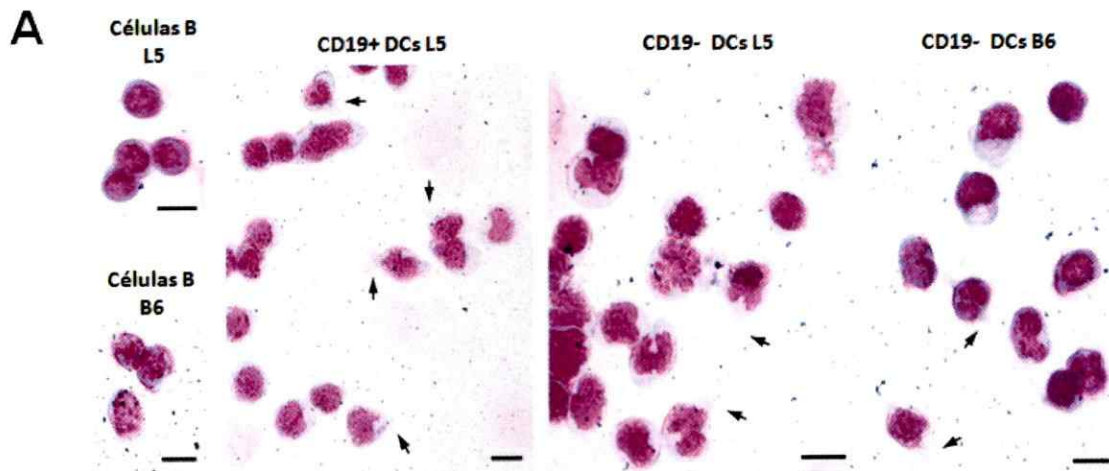


Figura 12. Las DCs de bazo CD11c+ CD19+ y CD11c+ CD19- provenientes de ratones lúpicos L5 secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a CpG comparada con DCs de ratones normales. Las DCs de bazo de los ratones lúpicos (L5) y normales (B6) se purificaron por *cell sorting* de acuerdo a la expresión de CD11c y CD19. (A) DCs de bazo CD19+ CD11c+ y CD19- CD11c+ y linfocitos B (CD11c-B220+) se tiñeron con la solución de Giemsa y se montaron en cubreobjetos. Todas las imágenes se tomaron con una magnificación de 40X. (B) Las DCs de bazo se cultivaron a $0,5 \times 10^6$ células/ml en presencia de 100ng/ml de LPS, 10 μ g/ml de CpG o 10 μ g/ml de R837 durante 24 horas. La secreción de IL-10 en los sobrenadantes se determinó mediante un ELISA de captura. El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Las DCs del bazo de ratones lúpicos L5 son más eficientes en inducir la diferenciación de linfocitos B normales a células plasmáticas en presencia de CpG.

Existen varios reportes donde se ha involucrado a las DCs como fundamentales para la sobrevivencia de los linfocitos B y para su diferenciación a células plasmáticas (Dubois, Vanbervliet et al. 1997; Fayette, Durand et al. 1998; Jego, Pascual et al. 2005). En esta tesis se evaluó la capacidad de las DCs de bazo purificadas por *cell sorting* de inducir la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas. Para esto se realizó un co-cultivo durante 6 días de las DCs de bazo con linfocitos B normales en presencia o ausencia de CpG. Al cabo de 6 días de co-cultivo se evaluó el porcentaje de células plasmáticas mediante la expresión de los marcadores CD138 y B220. Se encontró que las DCs de ratones lúpicos en presencia de CpG inducen un incremento de treinta veces en el número de células plasmáticas comparadas con las DCs de bazo de ratones normales (Figura 13). Esto sugiere fuertemente que las DCs de ratones lúpicos L5 son más eficientes en estimular la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas, lo cual podría ser importante dentro de la patogénesis del lupus, una enfermedad caracterizada por un aumento en la producción de autoanticuerpos.

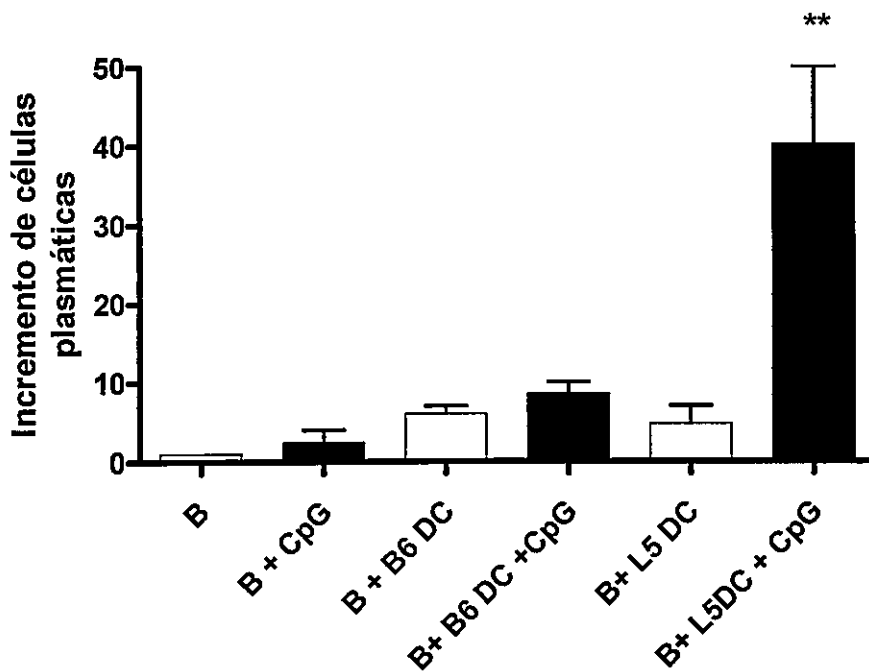


Figura 13. Las DCs de bazo de ratones L5 son más eficientes en la generación de células plasmáticas en presencia de CpG. Las DCs de bazo se purificaron en base a la expresión de CD11c de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, mientras que los linfocitos B fueron purificados a partir del bazo de ratones B6. Las DCs ($0,1 \times 10^6$ células/pocillo) y los linfocitos B ($0,05 \times 10^6$ células/pocillo) se co-cultivaron en una placa de 96 pocillos en $200 \mu\text{l}$ de cRPMI en presencia o ausencia de $10 \mu\text{g/ml}$ de CpG (ODN 1628) (Invivogen, USA) durante 6 días. Al día 6 de co-cultivo, se determinó el incremento de células plasmáticas de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los datos se analizaron con un test de ANOVA, ** $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

El LES es una enfermedad autoinmune crónica de origen multigénico y etiología desconocida (Santiago-Raber, Laporte et al. 2004). Dentro de los modelos más aceptados para el estudio de la enfermedad se encuentra la autoinmunidad sistémica desarrollada por algunas cepas de ratones. La principal manifestación de la enfermedad en los diferentes modelos murinos es la producción de altos niveles de auto-anticuerpos específicos contra antígenos nucleares. Esta característica es importante en la patogénesis de la enfermedad, ya que los autoanticuerpos se depositan en el glomérulo del riñón en la forma de complejos inmunes, lo cual desencadena el desarrollo de glomerulonefritis, una de las complicaciones más severas dentro esta enfermedad (Wakeland, Liu et al. 2001). Aunque los parámetros de la enfermedad en ratones son muy similares a los de la enfermedad en humanos, existen algunas diferencias como por ejemplo la presencia de los anticuerpos anti-Ro, La y Sm que han sido fuertemente asociados con la enfermedad sólo en humanos, así como las manifestaciones cutáneas y las complicaciones que involucran el cerebro y los pulmones (Wakeland, Liu et al. 2001). Sin embargo, los descubrimientos encontrados en los modelos murinos han ayudado al tratamiento de la enfermedad en humanos, lo cual valida parcialmente el uso de estos modelos para el estudio de la enfermedad.

Existen tres modelos murinos que desarrollan espontáneamente las manifestaciones típicas del lupus: 1) El modelo BWF1, el cual es el modelo clásico de

autoinmunidad sistémica murina; 2) La cepa de ratones MLR/lpr, la cual lleva la mutación *lpr* en el gen que codifica para el receptor de FAS en un fondo genético MLR la cual es susceptible a la autoinmunidad y 3) El modelo BXSB, el cual lleva el gen *yaa* un gen acelerador de autoinmunidad presente en el cromosoma Y en un fondo genético BXSB.

El modelo que más se acerca a la enfermedad en humanos es el modelo BWF1. Este modelo manifiesta una alta incidencia de la enfermedad en las hembras, además presenta altos niveles de ANA en el suero y desarrolla una glomerulonefritis mediada por complejos inmunes severa, todas manifestaciones típicas de la enfermedad en humanos (Wakeland, Liu et al. 2001). El modelo MLR/lpr manifiesta altos niveles de anticuerpos y glomerulonefritis, sin embargo estos son altamente dependientes de la mutación del receptor de FAS, la cual se ha visto que no tiene una asociación con la actividad de la enfermedad en humanos. El modelo BXSB sólo se manifiesta en los machos a diferencia de lo que ocurre con la enfermedad en humanos, la cual se manifiesta con una alta incidencia en las mujeres. Es por estas razones que elegimos el modelo BWF1, como uno de nuestros modelos para la realización de este estudio.

Lo primero que hicimos fue caracterizar los niveles de auto-anticuerpos de diferentes especificidades en el suero de estos ratones. Encontramos que los ratones BWF1 presentan niveles séricos elevados de ANA y de anticuerpos anti-ADNdh comparado con ratones normales NZWxBalb/c F1 (Figura 2A y 2B), lo cual está de acuerdo con los resultados mostrados previamente para este modelo por otros autores en

la literatura (Dixon, Andrews et al. 1978; Gioud, Kotzin et al. 1983).

Una manera de analizar la contribución individual de genes de susceptibilidad a una determinada enfermedad, es la disección congénica. Esta estrategia convierte un sistema poligénico responsable de la susceptibilidad a la enfermedad en varios sistemas monogénicos, a través de la producción de cepas congénicas individuales, cada una llevando un intervalo de susceptibilidad único en un fondo genético normal (Wakeland, Liu et al. 2001).

El análisis de las diferentes características asociadas a la patogénesis de la enfermedad, como la producción de auto-anticuerpos o el desarrollo de glomerulonefritis en estas cepas monogénicas, permite el reconocimiento de diferentes genes de susceptibilidad asociados a la expresión de una determinada característica patogénica. Por ejemplo las regiones de susceptibilidad Sle1 y Nba2, han sido asociadas a la producción de auto-anticuerpos específicos contra antígenos nucleares (Vyse, Rozzo et al. 1997) y es por ésto que además elegimos el modelo B6.Nba2 como modelo lúpico para el desarrollo de esta tesis.

El modelo murino B6.Nba2 contiene el locus de susceptibilidad Nba2 (*New Zealand Black autoimmunity 2*) en un fondo genético normal B6. El locus Nba2 es una región génica de aproximadamente 40Mb, derivada del cromosoma 1 de la cepa parental NZB. Nosotros elegimos este modelo para enfocarnos en los fenómenos asociados a la producción y efecto de auto-anticuerpos, ya que en este modelo no se produce daño

renal a pesar de que existe depósito de complejos inmunes en el glomérulo (Clynes, Dumitru et al. 1998). Para este análisis utilizamos diferentes cepas congénicas al modelo B6.Nba2, en las cuales distintos segmentos del locus Nba2 se han introducido en un fondo génico normal C57-B16 (B6).

Al analizar la producción de auto-anticuerpos en este modelo encontramos que tanto los ratones L5, que poseen el locus Nba2 completo, como los ratones L13, los cuales poseen solamente la región central de este locus (ver Figura 1), presentan niveles elevados de auto-anticuerpos en el suero. Esto extiende los resultados anteriores de otros autores para el locus Nba2 (L5) completo (Rozzo, Allard et al. 2001; Atencio, Amano et al. 2004) ya que hemos logrado acotar aún más la contribución de este locus, específicamente a los genes de la región central de este locus que se encuentran expresados en la cepa de ratones L13.

Más allá de los estudios de localización génica, nos hemos también abocado a investigar sobre los mecanismos celulares que llevan a el desarrollo de esta enfermedad. Así, en este estudio nos enfocamos en las células dendríticas (DCs) y su contribución al desarrollo del LES, específicamente en su papel sobre la producción de los auto-anticuerpos. Las DCs se encuentran en los tejidos periféricos censando la presencia de patógenos, tejidos necróticos e inflamación, estas señales inducen su maduración y su posterior migración hacia los órganos linfoides secundarios, donde inducen la respuesta inmune. En un estado inmaduro las DCs también son capaces de capturar antígenos propios, principalmente de células apoptóticas lo cual, a diferencia de los estímulos

patogénicos no induce su maduración. Estos antígenos son presentados a los linfocitos T en ausencia de las señales apropiadas de co-estimulación, lo que genera la inducción de tolerancia (Banchereau, Pascual et al. 2004). Por lo tanto, es evidente que las DCs son importantes tanto en el desarrollo de inmunidad como en la mantención de la tolerancia, lo cual las convierte en buenas candidatas para cumplir un papel en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus.

Existen varios antecedentes que abalan una participación de las DCs en el desarrollo del lupus. Los trabajos en la literatura coinciden en que hay una alteración en el fenotipo de las DCs de ratones lúpicos. Sin embargo, en este sentido no hay acuerdo ya que existen trabajos que indican que las DCs lúpicas poseen un fenotipo inmaduro (Phillips, Lomnitzer et al. 1988) mientras que otros que indican que poseen un fenotipo maduro comparado con las DCs de ratones normales (Zhu, Liu et al. 2005; Wan, Xia et al. 2007). La principal diferencia entre estos reportes es la cepa de ratones lúpicos utilizada en cada caso, lo que sugiere que el fenotipo de las DCs es altamente dependiente del fondo genético de cada cepa. En el caso de los pacientes con lupus tampoco existe un consenso acerca del estado de maduración de las DCs, si bien hay estudios que indican que el fenotipo de las DCs de estos pacientes es normal o inmaduro (Scheinecker, Zwolfer et al. 2001; Koller, Zwolfer et al. 2004) también hay otros que describen un fenotipo maduro comparadas con el fenotipo de las DCs de individuos normales (Decker, Kotter et al. 2006; Ding, Mehta et al. 2006). Además, se ha reportado una disminución del porcentaje de DCs en la sangre periférica en los pacientes con lupus (Cederblad, Blomberg et al. 1998; Blanco, Palucka et al. 2001; Blomberg, Eloranta et al.

2003), lo cual no se observa en el modelo murino donde se ha visto una acumulación de DCs CD11b⁺CD11c⁺ tanto en la sangre periférica (Ishikawa, Nagai et al. 2002) como en el bazo de ratones con lupus (Kalled, Cutler et al. 2001). Por otro lado, se ha determinado que la transferencia de DCs cargadas con auto-antígenos acelera el desarrollo de la enfermedad en ratones lúpicos BWF1 (Bondanza, Zimmermann et al. 2003) y que DCs cargadas con células necróticas inducen la producción de anticuerpos anti-ADNdh en una cepa no autoinmune C57BL/6, aunque estos tratamientos no inducen todas las manifestaciones características del lupus, a menos que las DCs sean inyectadas en una cepa susceptible a la enfermedad (Georgiev, Agle et al. 2005; Ma, Chan et al. 2005). Todos estos antecedentes, en su conjunto, abalan un papel importante de las DCs en el desarrollo de la enfermedad.

Ya que las DCs se encuentran en muy baja proporción en los diferentes órganos, alrededor del 1-2% del total de células, se han desarrollado métodos para diferenciar DCs a partir de precursores de médula ósea (BMDCs) cultivadas en presencia del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Marland, Bakker et al. 1996). La diferenciación a partir de precursores de médula ósea nos permite evaluar la influencia de factores intrínsecos de la DCs, ya que los precursores son diferenciados en un ambiente determinado principalmente por la presencia de GM-CSF. Por lo tanto, cualquier diferencia encontrada entre DCs normales y lúpicas se debería a un defecto propio de los precursores y no a un efecto del microambiente. Por el contrario, DCs purificadas directamente de los órganos linfoides permitiría determinar la influencia del microambiente donde éstas se encuentran. En esta tesis se caracterizaron

tanto las DCs generadas a partir de precursores de médula ósea como las aisladas directamente de órganos linfoides, particularmente de bazo, por ser el órgano desde donde se pueden obtener la mayor cantidad de células dendríticas.

La diferenciación de BMDCs en presencia de GM-CSF produce principalmente células del tipo mielóide, las cuales expresan el marcador de superficie CD11b y son homologas a las DCs convencionales del bazo (Brasel, De Smedt et al. 2000). Al evaluar el fenotipo de las BMDCs en los diferentes modelos de lupus encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MHC-II en las BMDCs de ratones lúpicos comparadas con BMDCs de ratones normales. Esto se correlaciona con el trabajo de (Yamauchi, Hashimoto et al. 2007) en el cual no se encuentran diferencias significativas entre el fenotipo de las BMDCs de ratones BWF1 y las cepas parentales, dentro de las cuales NZW se considera como un ratón normal.

Las DCs se caracterizan por ser células con capacidad de secretar diferentes citoquinas. Se ha sugerido que una desregulación de la producción de citoquinas o de la acción de éstas, podría jugar un papel central en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Horwitz and Jacob 1994; O'Shea, Ma et al. 2002).

Interleuquina-10 (IL-10) es una citoquina predominantemente anti-inflamatoria que inhibe la actividad de los macrófagos y de las DCs, aunque se ha demostrado que puede adquirir una actividad pro-inflamatoria durante el desarrollo de la respuesta inmune (Sharif, Tassiulas et al. 2004). Existen diversos estudios que relacionan a la IL-10 como un factor clave en la patogénesis del lupus. En humanos, se ha encontrado un

aumento de IL-10 en el suero de pacientes con lupus. Además, el título de IL-10 en el suero se correlaciona con la actividad de la enfermedad y con la producción de autoanticuerpos anti-ADNdh (Park, Lee et al. 1998; Chun, Chung et al. 2007). Por otro lado, la IL-10 estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B humanos a células plasmáticas (Rousset, Garcia et al. 1992) y se ha demostrado que la adición de IL-10 aumenta la producción espontánea de las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA producidas por las células mononucleares de la sangre periférica de pacientes con lupus (Llorente, Zou et al. 1995). Por otra parte, un estudio en 6 pacientes con lupus demostró que el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-10 es capaz de revertir las lesiones cutáneas y los problemas reumatológicos presentes en estos pacientes. En un modelo murino de lupus (BWF1) el tratamiento con anticuerpos anti-IL-10 retrasa el desarrollo de las manifestaciones de la enfermedad (Ishida, Muchamuel et al. 1994) mientras que la continua administración de IL-10 en ratones con susceptibilidad al lupus acelera el desarrollo de la enfermedad (Ishida, Muchamuel et al. 1994). Sin embargo, la misma cantidad de IL-10 administrada a una cepa no autoinmune no induce los síntomas de la enfermedad. Todos estos antecedentes sugieren que la IL-10 por sí sola no sería la causante de la enfermedad (Llorente, Richaud-Patin et al. 2000) pero que sí cumpliría un papel patológico en el desarrollo de la misma. Es por esto que evaluamos la producción de IL-10 tanto en las BMDCs como en la DCs purificadas directamente del bazo.

Al analizar la producción de citoquinas en las BMDCs no encontramos diferencias en la secreción de IL-10 en respuesta a estímulos patogénicos. Esto contradice los datos reportados por Yamauchi et al (2007), el cual muestra que BMDCs

de ratones BWF1 y de ratones NZB secretan mayores cantidades de IL-10 en respuesta a LPS. La principal diferencia con respecto a este reporte y nuestros resultados es la cepa normal utilizada como control ya que Yamauchi utiliza la cepa NZW como ratones normales y nosotros utilizamos la cruce de las cepas NZWxBalb/c como control lo que se acerca más a un control no susceptible. Todos estos antecedentes sugieren que las BMDCs de ratones lúpicos no presentan defectos intrínsecos que participen en el desarrollo de la enfermedad.

En consideración a que nuestros resultados muestran que no existirían diferencias en el fenotipo y producción de IL-10 entre DCs lúpicas y normales, caracterizamos las DCs aisladas directamente del bazo de ratones con lupus y normales, como una manera de determinar si el microambiente donde las DCs están inmersas, influencia el fenotipo o la funcionalidad de las mismas. El estudio de (Colonna, Dinnall et al. 2006) resalta un punto importante, el fenotipo de las DCs aisladas directamente de los órganos de los ratones puede diferenciarse completamente del fenotipo de BMDCs provenientes del mismo animal. Estas alteraciones son evidentes en DCs estudiadas *ex vivo*, lo que podría explicarse por un efecto del microambiente anormal desde donde las DCs se obtienen, lo cual no puede ser absolutamente reproducido en las DCs diferenciadas en condiciones normales o *in vitro*.

Las DCs de bazo se dividen principalmente en dos subpoblaciones, las DCs convencionales (cDCs) ($CD11c^+ B220^- CD11b^+$) y las DCs plasmacitoides (pDCs) ($CD11c^+ B220^+ CD11b^-$). Ambas subpoblaciones expresan el marcador de linaje CD11c

y los marcadores de superficie MHC-II, CD86 y CD40 (Banchereau, Briere et al. 2000). Al analizar el número absoluto de DCs encontramos que los ratones lúpicos BWF1, L5, L1, L12 y L13 poseen una mayor cantidad de pDCs comparado con ratones normales B6. Los ratones L9 tiende a presentar un mayor número absoluto de pDCs, sin embargo éste no es estadísticamente significativo. Lo mismo se observa en los ratones BWF1, L5, L12 y L13 al comparar el número de cDCs con ratones normales B6. En este caso tanto los ratones L9 como los ratones L11, poseen una tendencia a presentar un mayor número absoluto de cDCs, pero estos no alcanzan una significancia estadística. Se ha determinado previamente que tanto los ratones BWF1 como los ratones B6.Nba2 (L5) poseen esplenomegalia y un mayor número de células en el bazo (Atencio, Amano et al. 2004), lo cual explicaría el hecho de encontrar mayores números absolutos tanto de pDCs como de cDCs, lo cual se mantiene en la mayoría de las cepas congénicas derivadas de los ratones L5. Sin embargo, encontramos que al analizar el porcentaje de estas DCs, sólo las pDCs muestran diferencias significativas comparando los ratones lúpicos con los ratones normales. Los ratones BWF1, L5, L11, L12 y L13 muestran mayores porcentajes de pDCs comparados con ratones normales B6. Nuevamente, los ratones L9, los cuales poseen el segmento 5' del locus Nba2 (ver figura 1) no alcanzan una significancia estadística pero siguen la misma tendencia del resto de los ratones lúpicos. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de cDCs entre los ratones lúpicos y normales. En conclusión, los ratones lúpicos poseen un mayor porcentaje de pDCs, lo cual podría relacionarse con la presencia del segmento 3' del locus Nba2, ya que los ratones L9, los cuales poseen la región 5' del locus Nba2, no muestran diferencias significativas en el porcentaje de pDCs. Estos resultados están de

acuerdo con el trabajo de (Adachi, Taketani et al. 2002), donde se encontró que tanto los ratones lúpicos BWF1 como los ratones NZB, de los cuales proviene el locus *Nba2*, poseen un aumento en el porcentaje de células $CD11c^+$ en el bazo, aunque en este trabajo no se hizo la distinción entre las diferentes subpoblaciones de DCs. Sin embargo, el trabajo de Colonna, et al. (2006) muestra un mayor porcentaje de DCs en el bazo de ratones NZM2410, los cuales no poseen el locus *Nba2*, por lo que esta diferencia encontrada en los diferentes ratones derivados de L5 podría ser independiente de la presencia del locus *Nba2*.

Al analizar el fenotipo de las subpoblaciones de DCs en el bazo, encontramos que las pDC de ratones lúpicos poseen una menor expresión de CD86 y una mayor expresión de MHC-II, comparadas con las pDCs de ratones normales. Las cDCs de ratones lúpicos presentan una mayor expresión de MHC-II, sin embargo éstas no muestran diferencias en la expresión de CD86 comparadas con cDCs de ratones normales. El hecho de que las pDCs de ratones lúpicos posean una menor expresión de CD86 comparadas con las pDCs de ratones normales, podría tener implicancias en el desarrollo de la enfermedad, ya que las DCs tienen la capacidad de inducir la activación de los linfocitos T reguladores, lo cual se ha demostrado que es altamente dependiente de la expresión de CD86 (Yamazaki, Iyoda et al. 2003). Este podría ser uno de los mecanismos por los cuales las DCs lúpicas podrían promover el desarrollo de la enfermedad.

Las DCs del bazo tienen la capacidad de producir IL-10 en respuesta a patógenos

(Reis e Sousa, Diebold et al. 2003). Previamente se discutió la importancia de esta citoquina para el desarrollo de la enfermedad, por lo que quisimos evaluar la capacidad de secreción de esta citoquina en las DCs del bazo de los diferentes ratones. Evaluamos la secreción de IL-10 por parte de DCs de bazo CD11c⁺ en respuesta a estímulos patogénicos puros, como LPS o CpG y encontramos que las DCs del bazo de los ratones lúpicos BWF1, L5 (el cual posee el locus Nba2 completo) y L13 (el cual posee la región central del locus Nba2) (ver Figura 1), secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a LPS o CpG comparadas con DCs del bazo de ratones normales. Los ratones BWF1, L5 y L13, además son los ratones que presentan niveles elevados de auto-anticuerpos en el suero, lo que sugiere que IL-10 secretada por las DCs podría participar en este proceso. Como conclusión, la secreción de altos niveles de IL-10 por parte de las DCs de bazo lúpicas se correlaciona con la región central del locus Nba2, presente en los ratones L13.

La IL-6 es otra citoquina que se ha implicado en la patogénesis del lupus. (Wan, Xia et al. 2007) ha mostrado que las DCs de ratones lúpicos que presentan el locus Sle1, el cual representa la misma región génica que el locus Nba2 pero proveniente de la cepa NZW, secretan mayores cantidades de IL-6 en respuesta a estímulos patogénicos. Por lo tanto quisimos evaluar la secreción de esta citoquina en el modelo B6.Nba2 y en las cepas congénicas derivadas de este. No se encontraron diferencias en la secreción de esta citoquina entre las DCs de bazo de ratones lúpicos L5 (los cuales poseen el locus Nba2 completo) comparadas con las DCs de bazo de ratones normales B6. Por lo que podemos concluir que la secreción de esta citoquina no está influenciada por el locus Nba2 y que por lo tanto, los niveles elevados de IL-10 encontrados en las DCs de bazo

de ratones lúpicos no se deberían a un defecto en los mecanismos generales de secreción de las citoquinas.

Con el fin de confirmar que la secreción de IL-10 en respuesta a los estímulos patogénicos, es debida exclusivamente a las DCs, se realizó una purificación de las DCs mediante un *cell sorter* en base a la expresión de CD11c, lo cual incrementa la pureza de las DCs de un 70% a un 95%. Al analizar la secreción de IL-10 en estas DCs, encontramos que las DCs CD11c⁺ sólo secretan mayores niveles de IL-10 en respuesta a CpG. Se ha determinado que la inyección de CpG (ligando de TLR-9) en ratones con lupus acelera el desarrollo de la glomerulonefritis, proponiéndose que este estímulo actuaría mediante la activación de DCs (Pawar, Patole et al. 2006). Más aún, secuencias inhibitoras de TLR-7 y TLR-9 disminuyen los niveles de anticuerpos anti-ADNdh y previenen el daño renal (Pawar, Ramanjaneyulu et al. 2007). Esto destaca la importancia de CpG como estímulo patógeno en el desarrollo del lupus.

Dentro de este estudio encontramos que los ratones lúpicos poseen un incremento de una subpoblación de DCs que expresa CD11c y CD19, descrita como una población minoritaria en los ratones normales. Estas DCs tendrían un fenotipo regulador, ya que secretanIDO, una enzima involucrada en la degradación del triptófano, el cual es indispensable para la activación de linfocitos T efectores. (Baban, Hansen et al. 2005; Mellor, Baban et al. 2005). Para comprobar que estas células CD11c⁺ CD19⁺ son DCs realizamos una tinción de Giemsa, la cual confirmó que efectivamente las DCs CD19⁺ presentan las típicas prolongaciones características de las DCs y aun más determinamos

que esta población aparece a lo largo del transcurso de la enfermedad, ya que ratones jóvenes que no presentan la enfermedad, no muestran diferencias con los normales en el porcentaje de esta población. Por lo tanto, lo siguiente que nos preguntamos es si estas DCs son las responsables de la secreción de altos niveles de IL-10 en respuesta a los estímulos patogénicos. No encontramos diferencias en la secreción de IL-10 en respuesta a CpG, entre las DCs CD19⁺ y CD19⁻ aisladas mediante *cell sorter* ya que ambas poblaciones secretan altos niveles de IL-10 en respuesta a CpG comparadas con las DCs CD19⁻ de ratones normales. Como las DCs CD19⁺ en los ratones normales son muy escasas, esta población no se incluyó en el análisis. Como conclusión las DCs CD19⁺ no son las responsables de los niveles elevados de IL-10 secretada por las DCs de los ratones lúpicos en respuesta a estímulos patogénicos, por lo que no continuamos con el estudio de esta subpoblación en particular.

El lupus es una enfermedad mediada por linfocitos B debido a la naturaleza patogénica de los auto-anticuerpos. Por lo tanto, aquellos estímulos que induzcan la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, las cuales son las células productoras de anticuerpos, será considerado como un estímulo patogénico para el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado previamente que las DCs pueden reciclar los antígenos en forma intacta hacia la superficie celular, donde ahora se encontrarían disponibles para ser capturados por los linfocitos B (Wykes, Pombo et al. 1998). Esto haría que las DCs puedan actuar como fuente de antígeno para los linfocitos B y así ayudar directamente en su activación. Además se ha mostrado por microscopía intravital de dos fotones, que existe una interacción directa entre las DCs y linfocitos B en la

región extrafolicular de los linfonodos y que esta interacción es requerida para que los linfocitos B reconozcan su antígeno, lo que resaltaría la importancia de las DCs en la inducción de la respuesta inmune humoral (Qi, Egen et al. 2006). Por otra parte, se ha descrito que las DCs pueden modular directamente el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B (Dubois, Vanbervliet et al. 1997; Fayette, Durand et al. 1998) y que tanto las cDCs como las pDCs promueven el crecimiento y la diferenciación de células B a células plasmáticas a través de la secreción de IL-12, IL-6, IL-10, BAFF y APRIL (Balazs, Martin et al. 2002; MacLennan and Vinuesa 2002; Jego, Palucka et al. 2003). Todos estos antecedentes sugieren que un defecto en las DCs podría desencadenar la activación y diferenciación descontrolada de la respuesta inmune humoral, lo que tendría una gran relevancia para el desarrollo y la mantención del lupus.

Por lo tanto, evaluamos la capacidad de las DCs de inducir la diferenciación de linfocitos B vírgenes a células plasmáticas en presencia de estímulos patogénicos y encontramos que las DCs de ratones lúpicos L5 (los cuales poseen el locus *Nba2* completo) en presencia de CpG, inducen un incremento de alrededor de 30 veces del porcentaje de células que expresan CD138, un marcador de células plasmáticas, comparadas con DCs de ratones normales B6. Este resultado demuestra que efectivamente las DCs pueden participar en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas. En humanos hay varios reportes que muestran que las DCs de pacientes lúpicos aumentan la generación de células plasmáticas (Fayette, Durand et al. 1998; Wykes, Pombo et al. 1998; Wykes and MacPherson 2000). Sin embargo, la contribución de las DCs en el modelo murino ha sido difícil de comprobar, lo que resalta aún más el

aporte de este trabajo, ya que además de demostrar una acción de las DCs en el desenlace humoral de la enfermedad destaca la contribución de los genes del locus Nba2 en este proceso.

CONCLUSIÓN

Una de las principales conclusiones obtenidas durante la realización de esta tesis es:

Las DCs del bazo de ratones lúpicos al ser activadas mediante un estímulo patogénico como CpG, inducen un incremento en la diferenciación de linfocitos B vírgenes a células plasmáticas productoras de anticuerpos, probablemente a través de la secreción de IL-10.

ANEXOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han sido incluidos en un manuscrito, el cual se encuentra en preparación y que será enviado este año al Journal of Experimental Medicine o al Journal of Immunology, titulado

“Dissection of the NZB-derived Nba2 locus reveals a dendritic cell and B cell dysfunction that correlates with disease severity”. Trine N. Jørgensen,^{*1} Jennifer Alfaro,^{*2, 3} Stephanie Atencio,¹ Melanie R. Gubbels Bupp,¹ Christina Mailloux,¹ Troy Metzger,¹ Shannon Flannery,¹ Chinonye Ihekweazu,¹ Stephen S. Rozzo,¹ William M. Loo,³ Brian L. Kotzin,¹ María Rosa Bono,² Mario Roseblatt,³ and Loren D. Erickson⁴

* Estos autores comparten la autoría del manuscrito.

REFERENCIAS

- Adachi, Y., S. Taketani, et al. (2002). "Marked increase in number of dendritic cells in autoimmune-prone (NZW x BXSB)F1 mice with age." Stem Cells **20**(1): 61-72.
- Angelov, G. S., M. Tomkowiak, et al. (2005). "Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo." J Immunol **175**(1): 189-95.
- Atencio, S., H. Amano, et al. (2004). "Separation of the New Zealand Black genetic contribution to lupus from New Zealand Black determined expansions of marginal zone B and B1a cells." J Immunol **172**(7): 4159-66.
- Baban, B., A. M. Hansen, et al. (2005). "A minor population of splenic dendritic cells expressing CD19 mediates IDO-dependent T cell suppression via type I IFN signaling following B7 ligation." Int Immunol **17**(7): 909-19.
- Balazs, M., F. Martin, et al. (2002). "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses." Immunity **17**(3): 341-52.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J., V. Pascual, et al. (2004). "Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation." Immunity **20**(5): 539-50.
- Bayry, J., M. Thirion, et al. (2004). "Dendritic cells and autoimmunity." Autoimmun Rev **3**(3): 183-7.
- Bergtold, A., D. D. Desai, et al. (2005). "Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells." Immunity **23**(5): 503-14.
- Blanco, P., A. K. Palucka, et al. (2001). "Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus." Science **294**(5546): 1540-3.
- Blomberg, S., M. L. Eloranta, et al. (2003). "Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **48**(9): 2524-32.

- Bondanza, A., V. S. Zimmermann, et al. (2003). "Cutting edge: dissociation between autoimmune response and clinical disease after vaccination with dendritic cells." J Immunol **170**(1): 24-7.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brasel, K., T. De Smedt, et al. (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-39.
- Carroll, M. C. (2004). "The complement system in B cell regulation." Mol Immunol **41**(2-3): 141-6.
- Carroll, M. C. (2004). "A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus." Nat Rev Immunol **4**(10): 825-31.
- Cederblad, B., S. Blomberg, et al. (1998). "Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha-producing cells." J Autoimmun **11**(5): 465-70.
- Clynes, R., C. Dumitru, et al. (1998). "Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis." Science **279**(5353): 1052-4.
- Colonna, L., J. A. Dinnall, et al. (2006). "Abnormal costimulatory phenotype and function of dendritic cells before and after the onset of severe murine lupus." Arthritis Res Ther **8**(2): R49.
- Crispin, J. C. and J. Alcocer-Varela (2007). "The role myeloid dendritic cells play in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." Autoimmunity Reviews **6**(7): 450-456.
- Chen, C. J., K. H. Lin, et al. (2005). "High prevalence of immunoglobulin A antibody against Epstein-Barr virus capsid antigen in adult patients with lupus with disease flare: case control studies." J Rheumatol **32**(1): 44-7.
- Chun, H. Y., J. W. Chung, et al. (2007). "Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus." J Clin Immunol **27**(5): 461-6.
- Decker, P., I. Kotter, et al. (2006). "Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **45**(9): 1087-95.
- Ding, D., H. Mehta, et al. (2006). "Aberrant phenotype and

- function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus." J Immunol **177**(9): 5878-89.
- Dixon, F. J., B. S. Andrews, et al. (1978). "Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice." Arthritis Rheum **21**(5 Suppl): S64-7.
- Dubois, B., B. Vanbervliet, et al. (1997). "Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes." J Exp Med **185**(5): 941-51.
- Fang, Y., C. Xu, et al. (1998). "Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response." J Immunol **160**(11): 5273-9.
- Farkas, L., K. Beiske, et al. (2001). "Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions." Am J Pathol **159**(1): 237-43.
- Fayette, J., I. Durand, et al. (1998). "Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro." Scand J Immunol **48**(6): 563-70.
- Fields, M. L., C. L. Sokol, et al. (2001). "Fas/Fas ligand deficiency results in altered localization of anti-double-stranded DNA B cells and dendritic cells." J Immunol **167**(4): 2370-8.
- Georgiev, M., L. M. Agle, et al. (2005). "Mature dendritic cells readily break tolerance in normal mice but do not lead to disease expression." Arthritis Rheum **52**(1): 225-38.
- Gilbert, M. R., D. G. Carnathan, et al. (2007). "Dendritic cells from lupus-prone mice are defective in repressing immunoglobulin secretion." J Immunol **178**(8): 4803-10.
- Gioud, M., B. L. Kotzin, et al. (1983). "In vivo and in vitro production of anti-histone antibodies in NZB/NZW mice." J Immunol **131**(1): 269-74.
- Gubbels, M. R., T. N. Jorgensen, et al. (2005). "Effects of MHC and gender on lupus-like autoimmunity in Nba2 congenic mice." J Immunol **175**(9): 6190-6.
- Horwitz, D. A. and C. O. Jacob (1994). "The cytokine network in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and possible therapeutic implications." Springer Semin Immunopathol **16**(2-3): 181-200.
- Ishida, H., T. Muchamuel, et al. (1994). "Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice." J Exp Med **179**(1): 305-10.

- Ishikawa, S., S. Nagai, et al. (2002). "Increased circulating CD11b+CD11c+ dendritic cells (DC) in aged BWF1 mice which can be matured by TNF-alpha into BLC/CXCL13-producing DC." Eur J Immunol **32**(7): 1881-7.
- Ishikawa, S., T. Sato, et al. (2001). "Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC." J Exp Med **193**(12): 1393-402.
- Jego, G., A. K. Palucka, et al. (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-34.
- Jego, G., V. Pascual, et al. (2005). "Dendritic cells control B cell growth and differentiation." Curr Dir Autoimmun **8**: 124-39.
- Kalled, S. L., A. H. Cutler, et al. (2001). "Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti-CD154 treatment." J Immunol **167**(3): 1740-7.
- Koller, M., B. Zwolfer, et al. (2004). "Phenotypic and functional deficiencies of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients." Int Immunol **16**(11): 1595-604.
- Llorente, L., Y. Richaud-Patin, et al. (2000). "Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **43**(8): 1790-800.
- Llorente, L., W. Zou, et al. (1995). "Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus." J Exp Med **181**(3): 839-44.
- Ma, L., K. W. Chan, et al. (2005). "Systemic autoimmune disease induced by dendritic cells that have captured necrotic but not apoptotic cells in susceptible mouse strains." Eur J Immunol **35**(11): 3364-75.
- MacLennan, I. and C. Vinuesa (2002). "Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses." Immunity **17**(3): 235-8.
- Marland, G., A. B. Bakker, et al. (1996). "Dendritic cells in immune response induction." Stem Cells **14**(5): 501-7.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." Nat Rev Immunol **6**(11): 823-35.

- McCowan, C. B. (1998). "Systemic lupus erythematosus." J Am Acad Nurse Pract **10**(5): 225-31; quiz 232-4.
- Means, T. K., E. Latz, et al. (2005). "Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9." J Clin Invest **115**(2): 407-17.
- Mellor, A. L., B. Baban, et al. (2005). "Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling." J Immunol **175**(9): 5601-5.
- O'Shea, J. J., A. Ma, et al. (2002). "Cytokines and autoimmunity." Nat Rev Immunol **2**(1): 37-45.
- Park, Y. B., S. K. Lee, et al. (1998). "Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus." Clin Exp Rheumatol **16**(3): 283-8.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors and acquired immunity." Semin Immunol **16**(1): 23-6.
- Pawar, R. D., P. S. Patole, et al. (2006). "Ligands to nucleic acid-specific toll-like receptors and the onset of lupus nephritis." J Am Soc Nephrol **17**(12): 3365-73.
- Pawar, R. D., A. Ramanjaneyulu, et al. (2007). "Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus." J Am Soc Nephrol **18**(6): 1721-31.
- Phillips, R., R. Lomnitzer, et al. (1988). "Defective dendritic cell accessory function in NZB/W F1 hybrid mice." J Clin Lab Immunol **25**(3): 139-42.
- Qi, H., J. G. Egen, et al. (2006). "Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells." Science **312**(5780): 1672-6.
- Rahman, A. and D. A. Isenberg (2008). Systemic Lupus Erythematosus. **358**: 929-939.
- Reis e Sousa, C., S. D. Diebold, et al. (2003). "Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 67-8.
- Rousset, F., E. Garcia, et al. (1992). "Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1890-3.
- Rozzo, S. J., J. D. Allard, et al. (2001). "Evidence for an interferon-inducible gene, *Ifi202*, in the susceptibility to systemic lupus." Immunity **15**(3):

435-43.

- Santiago-Raber, M. L., C. Laporte, et al. (2004). "Genetic basis of murine lupus." Autoimmun Rev **3**(1): 33-9.
- Scheinecker, C., B. Zwolfer, et al. (2001). "Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus: phenotypic and functional deficiencies." Arthritis Rheum **44**(4): 856-65.
- Sharif, M. N., I. Tassiulas, et al. (2004). "IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis." J Immunol **172**(10): 6476-81.
- Shi, L., J. S. Wang, et al. (2007). "Upregulated functional expression of Toll like receptor 4 in mesenchymal stem cells induced by lipopolysaccharide." Chin Med J (Engl) **120**(19): 1685-8.
- Shlomchik, M. J., M. P. Madaio, et al. (1994). "The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity." J Exp Med **180**(4): 1295-306.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- ter Borg, E. J., G. Horst, et al. (1990). "Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study." Arthritis Rheum **33**(5): 634-43.
- Vyse, T. J., S. J. Rozzo, et al. (1997). "Control of multiple autoantibodies linked with a lupus nephritis susceptibility locus in New Zealand black mice." J Immunol **158**(11): 5566-74.
- Wakeland, E. K., K. Liu, et al. (2001). "Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus." Immunity **15**(3): 397-408.
- Wan, S., C. Xia, et al. (2007). "IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+CD25+ T cell regulatory functions." J Immunol **178**(1): 271-9.
- Wykes, M. and G. MacPherson (2000). "Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals." Immunology **100**(1): 1-3.
- Wykes, M., A. Pombo, et al. (1998). "Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response." J Immunol **161**(3): 1313-9.

- Yamauchi, M., M. Hashimoto, et al. (2007). "Ifi202, an IFN-inducible candidate gene for lupus susceptibility in NZB/W F1 mice, is a positive regulator for NF-kappaB activation in dendritic cells." Int Immunol **19**(8): 935-42.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, et al. (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med **198**(2): 235-47.
- Zhu, J., X. Liu, et al. (2005). "T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells." J Clin Invest **115**(7): 1869-78.