

UCH-FC
Biotecnología
C 932
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



**"PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES SLAM F1 Y F6 EN
EL DESARROLLO DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO"**

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

NATALIA PÍA CRISÓSTOMO TORO

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora del Seminario de Título

Dr. Mario Roseblatt Silber
Co-Director del Seminario de Título

Diciembre 2013
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Natalia Pía Crisóstomo Toro**

“PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES SLAM F1 Y F6 EN EL DESARROLLO DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. María Rosa Bono
Director Seminario de Título

María Rosa Bono

Dr. Mario Rosemblatt
Co-Director Seminario de Título

Mario Rosemblatt

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Tulio Núñez
Presidente Comisión

Marco Tulio Núñez

Dra. Daniela Sauma
Evaluador

Daniela Sauma



Santiago de Chile, Diciembre 2013



BIOGRAFÍA



Nací un miércoles 10 de junio del año 1987, en Santiago, Chile. Desde pequeña me interesó el mundo natural y mi curiosidad me llevó durante mis años de colegio a dedicarme al área de la biología. Luego el año 2006 ingresé a Bachillerato en la Universidad de Chile y emprendí mi camino en busca de una carrera que me forjara como investigadora. Así descubrí Ingeniería en Biotecnología Molecular, una carrera de la cual siempre se dice que tiene “mucho futuro” pero que aquí en Chile en realidad no se ha explotado lo suficiente. Luego de cursar el ramo de Inmunología en el año 2010, desarrollé un gran interés por esta área, atendida su gran proyección en el campo de la medicina y el desafío que implica llegar a descubrir medios para la cura y tratamiento de enfermedades que afectan a los seres humanos y animales, tanto así que a fines de dicho año ingresé al laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile a cargo de la Dra. María Rosa Bono. Finalizando esta primera etapa puedo decir que me sigue fascinando la ciencia, a pesar de las inherentes frustraciones que conlleva, y espero poder continuar desarrollándola con entusiasmo y dedicación.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente a todos los que me apoyaron durante la realización de este seminario de título.

A la Dra. María Rosa Bono por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Inmunología, permitirme desarrollarme como científica y depositar su confianza en mí.

Al Dr. Mario Roseblatt por ser el co-tutor de mi tesis y aportar con sugerencias y consejos durante las reuniones de laboratorio.

Me gustaría agradecer con especial ímpetu a la Dra. Alejandra Gleisner, por guiarme y entregarme todo su conocimiento científico sin el cual este trabajo no se podría haber llevado a cabo.

Mi respeto y agradecimiento a los ratoncitos de laboratorio, sin ellos la ciencia no avanzaría.

Al inmunolab por compartir a diario y hacer del trabajo un lugar ameno al cual asistir. En especial al Leito por su alegría, cariño, conocimientos y absoluta disposición a ayudar. A los amigos que ingresaron junto a mí al laboratorio, Vale, Coté, Juanjo, gracias por compartir discusiones de vida, del ámbito científico y las infaltables copuchas. A los "niños", Cony, Domi y Felipe, por inyectar energías renovadoras al inmunolab. A las demás grandes científicas del laboratorio; Dani, Gaby, Yessia, Sarah, Pauli, Paula, y Cami, por la simpatía y compañía. Por último a la Pame, Zoila y Óscar por la buena disposición y cariño.

Dado que el seminario de título es la etapa final de un largo recorrido desde Bachi a Biotek, no puedo sino agradecer a todos aquellos que me acompañaron e hicieron de esta travesía una inolvidable. Gracias a mis compañeros Biotek; Rolo, Talo, Mati, Caty, Isma, Hernan, Panchi, Aliosha, Marlene y Nico, por los buenos momentos vividos. En especial a Bea, por aparecer recién durante mis últimos años de carrera y quien se convirtió en una gran confidente y amiga del alma.

Finalmente agradecer a mi familia, en especial a mis padres, quienes me han dado su apoyo incondicional durante esta travesía. Gracias por el amor, paciencia y confianza, espero no defraudarlos nunca y les agradezco infinitamente su apoyo en todas mis decisiones de vida.

Le agradezco a la vida por darme el don de la curiosidad y a la naturaleza que nunca deja de sorprenderme.

Lo importante es no cesar de hacerse preguntas.

Albert Einstein

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado a través de los proyectos FONDECYT 1100557, 1100448, AT24100212 y CONICYT PFB-16.

ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Sistema Inmune	5
1.2. Tolerancia Inmune y Autoinmunidad	5
1.3. Lupus Eritematoso Sistémico	7
1.4. (NZB/W)F1 como modelo murino del lupus eritematoso sistémico.....	9
1.5. Factores genéticos asociados al desarrollo del lupus.....	10
1.5.1. Los receptores SLAM y las proteínas adaptadoras asociadas a SLAM.	10
1.5.2. Aspectos funcionales de los receptores SLAM.	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
2.1. HIPÓTESIS.....	15
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	15
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. MATERIALES.....	16

3.1.1.	Animales.....	16
3.1.2.	Anticuerpos.....	16
3.1.3.	Reactivos.....	17
3.1.4.	Equipos.....	18
3.1.5.	Programas	18
3.2.	MÉTODOS	19
3.2.1.	Citometría de Flujo	19
3.2.2.	Aislamiento por cell sorter de diferentes sub-poblaciones celulares en ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles.....	20
3.2.3.	Co-cultivo de linfocitos T, B y DCs (controles y lúpicos)	22
3.2.4.	Determinación de la expresión de SAP y EAT-2.....	22
3.2.5.	Análisis Estadístico.....	24
4.	RESULTADOS	25
4.1.	Expresión de los receptores SLAM y proteínas adaptadoras en LT durante el desarrollo del lupus.....	25
4.2.	Expresión de los receptores SLAM y proteínas adaptadoras en LB durante el desarrollo del lupus.....	31
4.3.	Expresión de proteínas adaptadoras asociadas a SLAM en células dendríticas durante el desarrollo del lupus.	39
5.	DISCUSIÓN.....	42
5.1.	Expresión alterada de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 en los LT de ratones lúpicos.....	43
5.2.	LT de ratones lúpicos aumentan la expresión de SLAM F6 y SLAM F1 en LB e inducen su proliferación.	48

5.3.	Proteínas adaptadoras de SLAM, SAP y EAT-2, en DCs no contribuyen al desarrollo del lupus.....	52
6.	RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	55
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vías de señalización de SLAM/SAP en LT	12
Figura 2.	Expresión de SLAM F1 en LT CD4+ activados con anti-CD3 en presencia de DCs y/o LB.	26
Figura 3.	Expresión de SLAM F6 en LT CD4+ activados con anti-CD3 en presencia de DCs y/o LB.	29
Figura 4.	Expresión de SAP en linfocitos T de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos.	30
Figura 5.	Expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en LB cultivados en presencia de DCs y LT CD4+ activados.	33
Figura 6.	LTv CD4+ de ratones lúpicos promueven la proliferación de LB.	35
Figura 7.	LB de bazo de ratones lúpicos sobreexpresan EAT-2 respecto a ratones pre-lúpicos y controles.	37
Figura 8.	LB de bazo de ratones lúpicos sobreexpresan SAP en comparación a ratones pre-lúpicos y controles.	39
Figura 9.	Expresión de EAT-2 en cDC y pDC de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	: Anticuerpo Antinuclear
APC	: Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell)
APS	: Persulfato de Amonio (Ammonium Persulfate)
BSA	: Albúmina de suero de bovino (Bovine Serum Albumin)
cDC	: Célula dendrítica convencional (Conventional Dendritic Cell)
DCs	: Células Dendríticas (Dendritic Cells)
DMSO	: Dimetilsulfóxido
EAT-2	: Transcrito-2 asociado a sarcoma de Ewing (Ewing's sarcoma-Associated Transcript-2)
EBV	: Virus de Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus)
ERT	: Transductor relacionado a EAT-2 (EAT-2-Related Transducer)
FCS	: Suero fetal bovino (Fetal Calf Serum)
FMO	: Fluorescencia menos uno (Fluorescence Minus One)
Ig	: Inmunoglobulinas
IL	: Interleuquina
ITSM	: Motivo de cambio de inmunorreceptor basado en tirosina (Immune Receptor Tyrosine Based Switch Motifs)
IMF	: Intensidad Media de Fluorescencia
LB	: Linfocito B
LES	: Lupus Eritematoso Sistémico
LT	: Linfocito T
Nba2	: Locus 2 de susceptibilidad a autoinmunidad de la cepa New Zealand White (New Zealand Black autoimmunity 2)
NK	: Célula Natural Killer
NKT	: Linfocito T natural killer (Natural Killer T cell)

NZB	: New Zealand Black
NZW	: New Zealand White
(NZB/W)F1	: Primera generación de crías de una cruce entre ratones NZB y NZW
PBS	: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)
pDC	: Célula dendrítica plasmacitoide (Plasmacytoid Dendritic Cell)
PKC-θ	: Proteína Quinasa C-theta (Protein Kinase C-theta)
PMSF	: Fenilmetilsulfonilo Fluoruro (Phenylmethylsulfonyl fluoride)
SAP	: Proteína asociada a SLAM (SLAM-Associated Protein)
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SH2	: Homología Src 2 (Src Homology-2)
SLAM	: Molécula linfocitaria activadora de señales (Signalling Lymphocyte Activation Molecule)
Sle1	: Locus murino de susceptibilidad a lupus eritematoso sistémico 1 (Systemic lupus erythmatosus susceptibility 1)
XLP	: Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (X-linked Lymphoproliferative Syndrome)

RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una hiperactividad de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), los que generan autoanticuerpos que forman complejos inmunes que se depositan en el riñón generando glomerulonefritis y finalmente daño renal. Existen múltiples factores, tanto ambientales como genéticos que gatillan su desarrollo. Diversos estudios tanto en pacientes como en modelos murinos del lupus han permitido identificar múltiples loci de susceptibilidad. La región telomérica del cromosoma 1q en humanos y su homólogo 1 en ratones contiene el locus *Sle1/Nba2* el cual ha sido relacionado con el quiebre de la tolerancia y la producción de autoanticuerpos. Este locus se ha correlacionado con el inicio de la enfermedad en el modelo murino (NZB/W)F1, el cual desarrolla lupus espontáneamente. Dicho locus contiene entre otros, los genes que codifican para los nueve miembros de los receptores de la familia SLAM, expresados tanto en células del sistema inmune innato como adaptable. Los receptores SLAM tienen funciones co-estimuladoras y actúan mediante interacciones homotípicas o heterotípicas. Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que LT CD4+ y linfocitos B de bazo de ratones lúpicos de la cepa (NZB/W)F1 expresan endógenamente altos niveles de SLAM F1 y SLAM F6 en comparación a ratones pre-lúpicos y controles.

En este seminario de título analizamos el efecto de células presentadoras de antígeno (APCs), tal como las células dendríticas (DCs) y los linfocitos B, sobre el nivel de expresión de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 en LT CD4+. Por otro lado la señalización a través de los receptores SLAM requiere de las proteínas adaptadoras

asociadas a estos, SAP y EAT-2. Estas proteínas fueron evaluadas durante el transcurso de la enfermedad mediante Western blot en LB, LT y distintas subpoblaciones de DCs provenientes del bazo de ratones (NZB/W)F1.

Los resultados más significativos obtenidos en este trabajo muestran que la activación policlonal de LTv en presencia de APCs aumenta la expresión de SLAM F6 y disminuye la expresión de SLAM F1 en LT CD4+ de bazo de ratones lúpicos. Por otra parte, los LT CD4+ de ratones lúpicos inducen la proliferación de LB e inducen un aumento de la expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en LB. Análisis de Western blot de las proteínas adaptadoras de SLAM en las diferentes sub-poblaciones celulares presentes en el bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles demuestra un incremento significativo de SAP y EAT-2 sólo en LB de ratones lúpicos.

Por lo tanto, el conjunto de estos resultados sugiere que durante el desarrollo del lupus en el modelo murino (NZB/W)F1, la activación de los LT CD4+ mediante APCs induciría la proliferación de los LB y un aumento de la expresión de los receptores SLAM. Esto promovería las interacciones entre LT y LB contribuyendo así a la activación anormal de los LB observada durante el lupus. Así, los linfocitos de ratones lúpicos presentan una expresión alterada de los receptores SLAM indicando una posible contribución de estos al desarrollo y mantención de la enfermedad en ratones (NZB/W)F1.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by hyperactive T lymphocytes and auto reactive B cells which give rise to the production of autoantibodies which latter form immune complexes that are deposited mainly in the kidney generating glomerulonephritis and kidney damage. The ethiology of this disease is multifactorial, and both environmental and genetic phenomena trigger its development. Diverse studies in human patients and murine lupic models have allowed the identification of multiple susceptibility loci. Located on the telomeric region of human chromosome 1q and its homologue 1 in mice, Sle1/Nba2 locus has been implicated with the loss of tolerance and the production of autoantibodies. This locus has been correlated with the initiation of the disease in the spontaneous lupus murine model (NZB/W)F1. This locus contains the genes that codify for the receptors of the SLAM family, of which nine members have been identified, and are expressed in both innate and adaptive immune cells. SLAM receptors have costimulatory functions and are involved in homotypic or heterotypic interactions between immune cells through their extracellular domain. Previous results from our laboratory demonstrated an endogenous increase in the expression of SLAM F1 and SLAM F6 in splenic B and CD4+ T cells during the development of lupus in the (NZB/W)F1 strain in comparison to control and pre-lupic mice.

The objective of the following thesis seminar was to analyze the effect of splenic antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs) and B lymphocytes, on the expression of SLAM F1 and SLAM F6 receptors on CD4+ T cells. On the other

hand, signaling through SLAM receptors requires the participation of the adaptor proteins, SAP and EAT-2. These proteins were evaluated throughout the course of the disease by Western blot in splenic B and T cells, and in two subsets of splenic DCs from (NZB/W)F1 mice.

The most significant results obtained during this work show that polyclonal activation of naïve T cells in the presence of APCs increases SLAM F6 expression and decreases SLAM F1 expression on splenic CD4+ T lymphocytes from lupic mice. On the other hand CD4+ T cells from lupic mice induce the proliferation of B cells and induce an increase of SLAM F1 and SLAM F6 expression on B cells. Western blot analyses of the SLAM adaptor proteins in different splenic subpopulations present in lupic, pre-lupic and control mice show a significant increase of SAP and EAT-2 expression only in B cells from lupic mice.

Taken together these results suggest that during the development of lupus in the murine model (NZB/W)F1, APC activation of CD4+ T cells induces the proliferation of B lymphocytes and increases their SLAM receptor expression. This promotes T cell to B cell interactions which contribute to the abnormal activation observed in B cells under lupus. We conclude that lupic immune cells present an altered expression SLAM receptors indicating a possible contribution of these proteins to the development and maintenance of SLE in (NZB/W)F1 mice.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema Inmune

El sistema inmune tiene como función mantener la integridad de los individuos siendo capaz de orquestar la defensa contra una amplia variedad de agentes infecciosos y a la vez promover la tolerancia a las células propias y a los agentes extraños que no representen un peligro para la salud del individuo. Los mecanismos de defensa se componen de una reacción temprana llevada a cabo por la inmunidad innata y una respuesta tardía, donde participa la inmunidad adaptable. La inmunidad innata comprende todos los mecanismos bioquímicos y celulares que existen antes y durante la infección, con lo que se obtiene una respuesta oportuna y rápida ante una potencial amenaza, generando una primera línea de defensa frente a microorganismos. Por otro lado la inmunidad adaptable corresponde a mecanismos que se gatillan como respuesta ante una infección y que son capaces de aumentar en magnitud y capacidad de defensa ante exposiciones sucesivas a dicha infección, fenómeno conocido como la memoria inmune (Abbas y Lichtman, 2004).

1.2. Tolerancia Inmune y Autoinmunidad

La capacidad del sistema inmune de poder diferenciar lo patógeno o peligroso de lo no patógeno o inocuo, le permite ser tolerante con las células propias y rechazar de forma específica a aquellos agentes que representen un peligro para el organismo. La incapacidad de generar una respuesta inmune produce inmunodeficiencia, mientras que una respuesta inapropiada o excesiva, genera autoinmunidad o alergia, resultando en una condición fisiopatológica que generalmente se manifiesta como una enfermedad (Kyewski & Ludger, 2006).

La tolerancia inmune se define como la falta de respuesta a un antígeno luego de la exposición a éste. Durante la interacción de un linfocito con una célula presentadora de antígeno (APC), el linfocito puede activarse originando una respuesta inmune o inactivarse/eliminarse lo que produce tolerancia hacia ese antígeno. Aquellos antígenos que generan una respuesta inmune son conocidos como inmunógenos, a diferencia de los antígenos que generan tolerancia que se llaman tolerógenos. La tolerancia ante los antígenos propios o autoantígenos es una propiedad fundamental del sistema inmune, sin la cual se desarrollan enfermedades del tipo autoinmunes. La tolerancia contra autoantígenos es mantenida mediante varios mecanismos diferentes que logran impedir la maduración y activación de aquellos linfocitos autorreactivos potencialmente perjudiciales (Abbas y Lichtman, 2004).

La tolerancia puede ser definida como central o periférica. La tolerancia central se produce en los órganos linfoides primarios como resultado de la interacción entre antígenos y linfocitos autorreactivos inmaduros mientras que la tolerancia periférica es aquella producida en los tejidos periféricos. La tolerancia central permite que el repertorio linfocitario esté conformado por linfocitos maduros no autorreactivos. En los órganos linfoides primarios, los linfocitos T (en el timo) y los linfocitos B (en la médula ósea) pasan por un estadio en el que el encuentro con el antígeno provoca tolerancia en lugar de activación. Los antígenos presentes en los órganos linfoides primarios son principalmente autoantígenos, mientras que los antígenos presentes en los órganos linfoides periféricos son de diferente naturaleza, los cuales son capturados y transportados a los órganos linfoides secundarios por células presentadoras de antígenos (APC). La eliminación de los linfocitos autorreactivos

ocurre mediante tres mecanismos principales: la eliminación a través de la muerte celular por apoptosis, anergia o inactivación funcional sin muerte celular, y la supresión funcional de las funciones efectoras de los linfocitos mediante la acción de linfocitos T reguladores. La tolerancia central ocupa principalmente los mecanismos de eliminación, mientras que en la tolerancia periférica se producen los tres tipos de mecanismos (Abbas y Lichtman, 2004).

El fenómeno de autoinmunidad se genera ante la insuficiencia o pérdida de los mecanismos que normalmente mantienen la tolerancia en las poblaciones linfocitarias. La autoinmunidad puede surgir como consecuencia de una selección o regulación incorrecta de los linfocitos autorreactivos o por la presentación de autoantígenos en un contexto inflamatorio o la producción de neoantígenos. Tanto la susceptibilidad genética como factores ambientales se han visto involucrados en el desarrollo de autoinmunidad (Rioux y Abbas, 2005).

1.3. Lupus Eritematoso Sistémico

Aquellas enfermedades autoinmunes, donde las células efectoras de la enfermedad son los linfocitos B, se caracterizan por la producción de autoanticuerpos que forman inmunocomplejos los cuales son los causantes de la patología. Los inmunocomplejos se depositan y aglomeran en diferentes tejidos, sin importar la procedencia celular de los antígenos. La enfermedad se produce porque en la medida que los inmunocomplejos se depositan en los tejidos, éstos producen inflamación y atraen células fagocíticas que producen daño en los tejidos. Esto hace que las enfermedades autoinmunes generadas por la acumulación de

inmunocomplejos sean sistémicas, teniendo una escasa especificidad hacia tejidos u órganos (Yanaba y col., 2008).

Una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de inmunocomplejos es el lupus eritematoso sistémico (LES). El LES es una enfermedad autoinmune crónica que afecta a múltiples órganos y que se caracteriza por la presencia de linfocitos T hiperactivados y linfocitos B autorreactivos. En esta enfermedad se producen autoanticuerpos contra nucleoproteínas y ADN los cuales se depositan principalmente en el riñón, activan la cascada del complemento, reclutan neutrófilos, y producen un proceso inflamatorio que culmina con el daño renal (Carroll, 2004). El lupus afecta aproximadamente al 0,1% de la población mundial, principalmente mujeres en edad fértil. En Chile, hasta el año 2012 se estimaba que habían entre 12.000 y 16.000 pacientes con algún tipo de lupus, estableciéndose una prevalencia de la enfermedad de 70 a 91 casos por cada 100.000 habitantes. La susceptibilidad al lupus está dada por factores genéticos, ambientales y hormonales. La prevalencia de la enfermedad en gemelos monocigóticos (24%) comparado con gemelos dicigóticos (2%) demuestra la existencia de una componente genética en esta enfermedad (Strober y Gottesman, 2009). En humanos el lupus surge por un desorden poligénico donde las distintas combinaciones de los genes defectuosos darían origen a las diferentes manifestaciones de la enfermedad. Se atribuye un papel importante a los factores ambientales en el desarrollo del lupus ya que es necesario un evento gatillante para iniciar la enfermedad. A pesar que aún no se ha identificado con claridad dicho factor, existen varios candidatos como la luz UV, drogas, infecciones y estrés (Rahman & Isenberg, 2008). Por otro lado la gran diferencia que existe en la prevalencia del lupus entre hombres y mujeres (una razón de 9:1) sugiere la activa

participación de hormonas sexuales en la patogénesis de la enfermedad (Rahman e Isenberg, 2008).

El lupus es una enfermedad que no tiene cura y los tratamientos actuales son solo paliativos y difieren de un paciente a otro, dependiendo de cuáles son los principales síntomas a tratar. En general los tratamientos involucran terapia con corticoesteroides y agentes inmunosupresores, y por último quimioterapias immunoablativas con trasplante de médula ósea con el objetivo de generar un sistema inmune no susceptible a la enfermedad (Wentworth y Davies, 2009).

1.4. (NZB/W)F1 como modelo murino del lupus eritematoso sistémico.

Los modelos murinos más utilizados en el estudio del lupus son los ratones de la cepa MRL/lpr y la cepa BXSB/Yaa y la primera cruce entre las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW) que se denomina (NZB/W)F1. Por otro lado, es posible inducir lupus en una cepa endogámica luego de una estimulación con el alcano terpenoide pristano. Todos estos modelos presentan distintos síntomas de la enfermedad similares a los observados en el lupus humano, como producción de anticuerpos, activación linfoide, hiperplasia y nefritis lúpica.

Durante este seminario de título se utilizó el modelo (NZB/W)F1, donde las cepas NZW como NZB muestran pocas características de autoinmunidad, mientras que las hembras derivadas de la cruce de estas dos cepas desarrollan varios de los síntomas del lupus. En este modelo, las hembras son notablemente más susceptibles a desarrollar la enfermedad que los machos (Gubbels y col., 2005). Los ratones (NZB/W)F1 hembra desarrollan espontáneamente, en un periodo relativo

entre 6 a 10 meses de edad, una enfermedad autoinmune caracterizada por la alta producción de anticuerpos antinucleares (ANAs) en el suero (incluyendo anti-dsADN IgG cuya mayoría es IgG2a e IgG3) y por el desarrollo de una glomerulonefritis fatal mediada por complejos inmunes que deriva finalmente en una falla renal y muerte a los 10-12 meses de edad (Perry y col., 2011). Se considera que la cepa (NZB/W)F1 es el modelo que mejor replica los síntomas observados durante la enfermedad del lupus en humanos. Sin embargo, a diferencia de los pacientes con LES y los modelos MRL/lpr y BXSB/Yaa, los ratones (NZB/W)F1 carecen de autoanticuerpos contra ARN (Perry y col., 2011).

1.5. Factores genéticos asociados al desarrollo del lupus.

1.5.1. Los receptores SLAM y las proteínas adaptadoras asociadas a SLAM.

A pesar que la etiología de LES es desconocida, numerosos estudios han demostrado la existencia de distintos factores genéticos que contribuyen al riesgo de desarrollar la enfermedad (Wakeland y col., 2001; Fairhurst y col., 2006). En la región telomérica del cromosoma 1 de ratones y su equivalente 1q en humanos se ubica el locus *Sle1/Nba2*. Este locus es responsable del quiebre en la tolerancia hacia nucleosomas, de la producción de anticuerpos antinucleares y ha sido implicado en la iniciación de la enfermedad en el modelo murino (NZB/W)F1. Dicho locus contiene una familia de genes que codifican para los receptores SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*), proteínas de superficie involucradas en interacciones célula-célula (Calpe y col., 2008).

La familia de genes SLAM está compuesta por nueve receptores, denominados SLAM F1 (CD150), SLAM F2 (CD48), SLAM F3 (CD229 o Ly9), SLAM F4 (CD244 o 2B4), SLAM F5 (CD84), SLAM F6 (NTB-A o Ly108), SLAM F7 (CD319 o CRACC), SLAM F8 (BLAME) y SLAM F9 (SF2001). Los receptores de la familia SLAM se expresan en distintas células del sistema inmune, incluyendo LT activados, LB, macrófagos y células dendríticas (DCs) y se encuentran relacionados con la regulación tanto de la inmunidad innata como la adaptable. Además cada tipo celular es capaz de expresar uno o más receptor(es) SLAM. Los receptores SLAM producen interacciones homotípicas y heterotípicas de una gran variedad de afinidades ($K_d \sim 0,5-200 \mu M$) lo que podría contribuir a la regulación del sistema inmune (Chan y col., 2006; Veillette y col., 2006 a; Calpe y col., 2008). Los receptores SLAM están compuestos de dos o cuatro dominios tipo inmunoglobulinas en su región extracelular, un segmento de transmembrana y un dominio citoplasmático con múltiples motivos ITSMs (*Immune receptor Tyrosine based switch motifs*) (Calpe y col., 2008).

Los receptores SLAM se asocian a proteínas de la familia SAP, moléculas adaptadoras intracelulares responsables de la transducción de señales. Esta familia está compuesta por SAP (*SLAM Associated Protein*), EAT-2 (*Ewing's sarcoma-associated transcript-2*) y ERT (*EAT-2-related transducer*). Los genes que codifican para EAT-2 y ERT se localizan en tándem en el cromosoma 1, vecino al locus SLAM, mientras que el gen que codifica para la proteína SAP se localiza en el cromosoma X (Vilar y col., 2011). Estas moléculas adaptadoras representan a una familia de proteínas citoplasmáticas compuestas por un único dominio de homología SH2, y una pequeña región carboxi-terminal. El gen SAP se expresa en una gran

variedad de células hematopoyéticas como LT, NK, células NKT, LB, eosinófilos y plaquetas (Calpe y col., 2008). En contraste, EAT-2 se expresa en NK, DCs y macrófagos, mientras que ERT solo se expresa en células NK murinas (Calpe y col., 2008). Durante la activación celular de LT mediada por células dendríticas, los receptores SLAM en la superficie de cada célula interaccionan gatillando el reclutamiento de proteínas adaptadoras las cuales en el caso de los LT activan la tirosina quinasa Fyn, la cual a su vez fosforila SLAM activando el factor de transcripción nuclear NF- κ B dependiente de la proteína quinasa C-theta (PKC- θ) lo cual conlleva un incremento de citoquinas tipo TH2 y una disminución de IFN- γ gracias a la activación del factor de transcripción GATA-3 (Fig. 1) (Vilar y col., 2011).

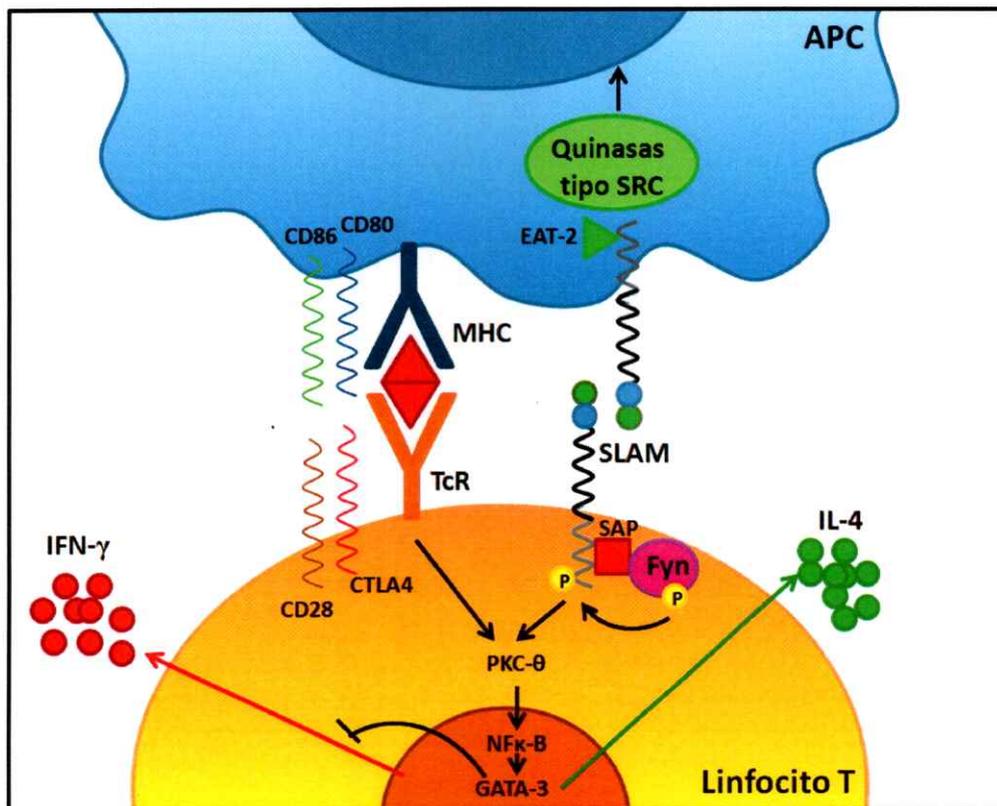


Figura 1. Vía de señalización SLAM/SAP en el LT. Luego de la activación mediante el receptor de LT (TCR), SAP se une a la cola citoplasmática de SLAM e induce el reclutamiento y activación de la tirosina quinasa Fyn. Por su parte Fyn fosforila a SLAM lo

que gatilla el reclutamiento de un complejo señalizador que transloca al núcleo y activa al factor de transcripción GATA-3. Esta vía de señalización inhibe selectivamente la producción de IFN- γ y aumenta la producción de IL-4, en linfocitos T activados.

1.5.2. Aspectos funcionales de los receptores SLAM.

Los receptores de la familia SLAM y sus adaptadores intracelulares han sido implicados en importantes aspectos de la regulación inmune como la proliferación de los LT y LB, producción de citoquinas, activación de LB, polarización de LT hacia TH2 (Calpe y col., 2008), cambio de isotipo de los LB, mantención de células plasmáticas, formación de los centros germinales entre otras funciones (Veillette, 2006 b; Wang y col., 2004; Rethi y col., 2006).

Las distintas funciones de los receptores SLAM han sido elucidadas gracias a la generación de ratones knock-out para miembros individuales de la familia SLAM. Ratones knock-out para SLAM F1 presentan una disminución en la producción de citoquinas tipo TH2, aumento de citoquinas tipo TH1, como IFN- γ y una disminución de TNF- α . Por otro lado la falta de SLAM F6 en LT produce una disminución del fenotipo TH2 y un aumento de las citoquinas TNF- α e IL-6 (Veillette y col., 2006 b).

Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que LT y LB de bazo de ratones lúpicos de la cepa (NZB/W)F1 presentan una mayor expresión de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 en comparación a ratones pre-lúpicos y controles (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner, 2013).

Por otro lado, mutaciones del gen SAP en humanos produce un síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) (Cannons y col., 2004; Nichols y col.,

2005) que se caracteriza por una mononucleosis fulminante causada por el virus Epstein-Barr (EBV), disgamaglobulemia y desórdenes linfoproliferativos (Nichols y col., 2005). La generación de ratones knock-out para SAP han permitido estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el síndrome XLP. Ratones SAP^{-/-} exhiben una respuesta exagerada de tipo TH1 (Hron y col. 2004), una disminución en la respuesta citotóxica mediada por células NK (Bloch-Queyrat y col., 2005) y la inhabilidad de generar linfocitos B de memoria, debido a la disfunción de los LT (Hron y col. 2004). Por otra parte, los LB de pacientes con XLP presentan una falla en el cambio de clase de IgM a IgG que tiene como consecuencia una disminución en la respuesta contra EBV (Strober & Gottesman, 2009). La proteína adaptadora SAP también ha sido estudiada en el LES murino donde al disminuir o eliminarse por completo dicha proteína se disminuyen ciertos síntomas del lupus (Detre y col., 2010).

En conclusión, existen evidencias que muestran que los miembros de las familias SLAM y SAP se encuentran involucrados en el control de la autoinmunidad durante el desarrollo de LES. Estos resultados son congruentes con la idea que el cluster génico SLAM contribuye al desarrollo del lupus participando en la pérdida de tolerancia de los LB hacia antígenos nucleares, aunque el mecanismo involucrado no ha sido aun elucidado (Wakeland y col., 2001; Tangye y col., 2007).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La expresión alterada de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 contribuye al estado de hiperactivación en los linfocitos T y B durante el desarrollo del lupus.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Investigar la participación de los receptores SLAM y las vías de transducción de señales de estos receptores en el desarrollo del lupus.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1. Evaluar *in vitro* la expresión de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 en LT activados en presencia de DCs y LB provenientes de ratones controles y lúpicos.

2.3.2. Evaluar *in vitro* la expresión de los receptores SLAM F1 y F6 en LB durante su interacción con DCs y LT provenientes de ratones controles y lúpicos.

2.3.3. Estudiar mediante Western blot la expresión de las proteínas adaptadoras para la señalización a través de SLAM en linfocitos T, B y sub-poblaciones de células dendríticas de bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y control.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Animales

Se utilizaron ratones (NZB/W)F1 hembra provenientes de la cruce de las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW), a los cuales llamamos ratones pre-lúpicos (2 meses) y ratones lúpicos (10 meses). La enfermedad en ratones lúpicos fue evaluada mediante análisis de proteinuria (≥ 500 mg/dl proteína en la orina) medida de forma semi-cuantitativa utilizando tiras reactivas Combur Test N (Roche Diagnostics, Alemania) en conjunto con un análisis de anticuerpos contra ADN de doble hebra en el suero mediante un ensayo convencional de ELISA como ha sido descrito previamente (Gleisner y col., 2013).

Como control se utilizaron ratones de la cepa BALB/c pareados por sexo y edad. Los ratones (NZB/W)F1 se adquirieron en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EEUU). Los animales utilizados en este trabajo fueron mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida (Santiago, Chile). Los animales fueron sacrificados mediante una cámara de CO₂. El proyecto se realizó en acuerdo con las normas de bioética de la Facultad de Ciencias.

3.1.2. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para citometría de flujo: Adquiridos en eBioscience: anti-SLAM F6 (clon eBio1363-19D) conjugado a PE, anti-CD25 (clon PC61.5) conjugado a APC, anti-CD25 (clon PC61.5) conjugado a

PE, anti-CD11c (clon N418), anti-CD16/32 (Fc Block) (clon 93), anti-CD3e (clon 145-2C11). Adquiridos en BD Pharmingen: anti-CD4 (clon GK1.5) conjugado a APCH7, anti-CD79b (clon HM79b) conjugado a FITC. Adquiridos en BioLegend: anti-CD4 (clon GK1.5) conjugado a PeCy7, anti-CD4 (clon GK1.5) conjugado a FITC, anti-B220 (clon RA3-6B2) conjugado a Pcy7, anti-SLAM F1 (clon TC15-12F12.2) conjugado a APC.

Para depletar las muestras de LB y/o LT se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: adquiridos en BD Pharmingen: anti-CD79b (clon HM79b) conjugado a FITC, anti-Armenian Hamster IgG2/3 (clon G70-204) conjugado a FITC, anti-CD3 (clon 17A2) conjugado a FITC.

Para Western blot se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-SAP (clon 10C4.2) (eBioscience) y el anticuerpo policlonal anti-EAT-2 (abcam). Como anticuerpos secundarios se utilizó anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano y anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Dako). Además se utilizó el anticuerpo policlonal anti-actina de conejo (Sigma) para obtener los controles de carga.

3.1.3. Reactivos

Cultivo Celular: RPMI, IMDM, B-mercaptoetanol, Fungizona; PBS.

Bioquímica: Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific); Acrilamida: Bis-Acrilamida (Winkler); SDS (Bio-Rad); Metanol (TCL); TRIS (Bio-Rad); Glicina (Bio-Rad); TEMED (Bio-Rad); 2-Mercaptoetanol (Sigma); Azul de Bromofenol (Sigma);

PMSF; APS (Bio-Rad); Ponceau S (Sigma); Ácido Tricloroacético (Merck); Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem); Tween 20 (Merck); ortovanadato de sodio (Fisher Scientific); BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); Glicerol (GIBCO); BSA (Calbiochem); SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); Revelador D-76 (Jamarca); Fijador U-3 (Jamarca), Hyperfilm ECL (Amersham), Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences), Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), Perm/Wash (BD Biosciences).

Generales: DNAsa-I recombinante (Roche), Colagenasa D (Roche); agua bidestilada (Sanderson); RBC Lysis Buffer (BioLegend).

Otros: Urine Combur 4 Test N (Roche), Dynabeads Sheep-anti rat IgG (Invitrogen), Dynabeads Goat-anti mouse IgG (Invitrogen).

3.1.4. Equipos

- Citómetro de flujo FACSCanto II, BD Biosciences
- Espectrofotómetro Lambda Ez 201, PelkinElmer
- BD FACSAria III cell sorter, BD Biosciences
- Centrífuga 5804 R, Eppendorf
- Centrífuga 5402, Eppendorf

3.1.5. Programas

- BD FACSDiva v. 6.1.3, BD Biosciences, California USA

- FlowJo v7.6.5 32bit para Macintosh, Tree Star, Inc., Trustees of Leland Stanford, Oregon USA, <http://www.flowjo.com>
- GraphPad Prism 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com
- ImageJ 1.45s (Java 1.6.0_20 (32-bit)), Bethesda, Maryland, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Citometría de Flujo

Se utilizaron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por punto experimental. La unión inespecífica de anticuerpos se bloqueó incubando las células durante 15 min a 4°C con el anticuerpo CD16/32 (Fc Block) diluido en PBS + 2% FCS. Para detectar las moléculas de superficie las células fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes diluidos en PBS + 2% FCS durante 20 min a 4°C . Posteriormente fueron lavadas con PBS+ 2% FCS y centrifugadas a $600 \times g$ por 5 min a 4°C . Finalmente las células se resuspendieron en PBS + 2% FCS a una concentración de 2×10^6 células/mL para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). Las células muertas fueron descartadas utilizando yoduro de propidio ($1,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ por cada $0,5 \times 10^6$ células).

Los datos obtenidos fueron posteriormente analizados mediante el software FACSDiva (BD Biosciences) y/o el software FlowJo (Tree Star, Inc.)

3.2.2. Aislamiento por cell sorter de diferentes sub-poblaciones celulares en ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles.

Las diferentes sub-poblaciones linfocitarias se aislaron a partir de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. Para esto, los bazos fueron disgregados y luego digeridos en presencia de 1 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 20 U/mL de DNAsa-I (Roche) en medio PBS + 2% FCS por 45 min a 37°C con agitación suave. Posteriormente las suspensiones celulares fueron pasadas por una malla metálica de 90 µm, llevando a 10 mL con medio RPMI + 10% FCS. Luego se centrifugó a 470 × g por 7 min a 4°C, el pellet obtenido fue resuspendido en 2 mL de tampón RBC (BioLegend) e incubado durante 5 min a temperatura ambiente para lisar glóbulos rojos. Las células fueron posteriormente lavadas con RPMI + 10% FCS y finalmente resuspendidas en medio RPMI + 10% FCS.

Para los experimentos de co-cultivos se aislaron LT vírgenes (LTv), LB y DCs totales a partir de bazo de ratones lúpicos y controles. Para esto se marcaron los esplenocitos obtenidos con los anticuerpos anti-CD11c, anti-B220, anti-CD25 y anti-CD4 mediante el protocolo de marcaje extracelular con anticuerpos conjugados a diferentes fluoróforos. Las diferentes sub-poblaciones se aislaron mediante *cell sorter* según el siguiente fenotipo: LTv (CD11c-B220-CD25-CD4+), LB (CD11c-B220+CD25-CD4-), DCs (CD11c+CD25-CD4-). La pureza obtenida para los LTv y LB fue consistentemente superior al 90%, por otro lado hubo un enriquecimiento de DCs hasta un 80%. Las principales células contaminantes presentes en las muestras de DCs purificadas son linfocitos B y T.

Para los experimentos de Western blot se aislaron LT CD4+, LB, cDCs y pDCs a partir de bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles. Para esto se marcaron los esplenocitos con los anticuerpos anti-CD79b, anti-CD11c, anti-B220 y anti-CD4. Las diferentes sub-poblaciones se aislaron mediante *cell sorter* según el siguiente fenotipo: LT (CD79b-CD11c-B220-CD4+), LB (CD79b+CD11c-B220+CD4-), cDC (CD79b-CD11c+B220-) y pDC (CD79b-CD11c+B220+). Dado que las sub-poblaciones de células dendríticas se encuentran en un bajo porcentaje (aproximadamente 1-2%) las células totales de bazo utilizadas para purificar estas subpoblaciones fueron depletadas previamente de LT y LB. Para depletar de LB se incubó el extracto de células totales con el anticuerpo anti-CD79b FITC (clon HM79b) durante 15 min a 4°C en agitación. Las células luego fueron lavadas y posteriormente incubadas durante 15 min a 4°C, en oscuridad y agitación con el anticuerpo secundario anti- Armenian Hamster IgG2/3 FITC. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de 20×10^6 cel/mL en medio PBS + 2mM EDTA + 0,1%BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads Goat anti-Mouse IgG durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación el tubo con las células fue puesto en contacto con un magneto y se recuperó la fracción negativa. Posteriormente la fracción negativa fue depletada de LT. Para esto las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD3 FITC (clon 17A2) durante 15 min a 4°C en agitación y oscuridad. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de 20×10^6 cel/mL con medio PBS1X + 2mM EDTA + 0,1%BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads Sheep anti-Rat IgG durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación el tubo con las células fue puesto en contacto con un magneto y se recuperó la fracción negativa, la cual fue posteriormente marcada

con los anticuerpos anti-CD79b FITC, anti-CD11c PE y anti-B220 PeCy7, para lograr separar mediante cell sorter las células dendríticas convencionales (cDC) y plasmocitoides (pDC). La pureza de las poblaciones obtenidas fue siempre mayor a 97% para LT y 98% para LB. Por otro lado las sub-poblaciones de DCs obtuvieron un grado de enriquecimiento superior al 80% tanto para las cDC como las pDC.

3.2.3. Co-cultivo de linfocitos T, B y DCs (controles y lúpicos)

LT vírgenes (CD11c-B220-CD25-CD4+), LB (CD11c-B220+CD25-CD4-), y DCs (CD11c+CD25-CD4-) de bazo de ratones control y lúpicos fueron obtenidos mediante *cell sorting*. LTV vírgenes de un ratón control o lúpico fueron co-cultivados con DCs y/o LB provenientes de un ratón control o lúpico a una razón de 2:1:5 respectivamente, con 1µg/mL de anti-CD3 soluble. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo en medio IMDM con 10% FCS, 0,5µg/mL Fungizona y 0,05 µM B-mercaptoetanol. Las células fueron cultivadas durante 5 días a 37°C en un incubador con 5% CO₂ para luego medir la expresión de los receptores SLAM mediante citometría de flujo.

3.2.4. Determinación de la expresión de SAP y EAT-2.

La expresión de las proteínas adaptadoras EAT-2 y SAP fue analizada mediante Western blot. Linfocitos T y B, cDC y pDC (de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos) purificadas mediante *cell sorting* fueron lisados con tampón de lisis (SDS 7,5%; PMSF 7,5 mM; Na₃VO₄ 7,5 mM; Tris-Cl 75 mM pH 7,4; coctail inhibidor de proteasas) y centrifugadas a 14000 x g por 15 min a 4°C. Las proteínas totales fueron recuperadas del sobrenadante y almacenadas a -20°C hasta su utilización. Los extractos de proteínas fueron cuantificados mediante un ensayo BCA (Pierce

Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Para esto, 20 µg de proteína total fueron mezcladas con tampón de carga e incubadas durante 5 min a 100°C. La electroforesis se realizó a 50 V hasta que las muestras alcanzaran el gel concentrador y luego a 100 V. Transcurrido el tiempo de electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó durante 16 hrs a 4°C en una solución de PBS-Tween 20 0,1% + 3% de BSA. Las proteínas adaptadoras asociadas a SLAM fueron detectadas con el anticuerpo monoclonal anti-SAP (eBioscience) y el anticuerpo policlonal anti-EAT-2 (abcam) ambos diluidos a 1:250 en PBS-Tween 0,1%. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación. Luego se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón HRP-Pxd diluido 1:5.000 en PBS-Tween 20 0,1%.

Como control positivo de la presencia de la proteína SAP se utilizó un lisado de la línea celular Jurkat mientras que para la expresión de EAT-2 se utilizó como control positivo un lisado de la línea celular Devernelle. Como control de carga se evaluó la expresión de actina utilizando un anticuerpo anti-actina diluido 1:250 en PBS-Tween 20 0,1%, el cual se reveló con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP-Pxd diluido 1:5.000 en PBS-Tween 20 0,1%.

Para la estimación del peso molecular de las proteínas se ocupó el estándar BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen). Las membranas de nitrocelulosa

fueron reveladas en oscuridad utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, según las instrucciones del fabricante.

El análisis de la densidad relativa de las bandas obtenidas mediante Western blot se realizó con el programa ImageJ. La intensidad de las bandas fue cuantificada densitométricamente, normalizando con la intensidad cuantificada de las bandas de actina.

3.2.5. Análisis Estadístico

Los datos son presentados como el promedio \pm error estándar. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Los experimentos de co-cultivo fueron evaluados mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn. Los experimentos de expresión relativa proteica fueron analizados estadísticamente mediante el test no paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si $p < 0.05$. En los gráficos ilustrados los asteriscos indican * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Para el análisis estadístico y la confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad PRISM 5 (GraphPad Software Inc., EE.UU).

4. RESULTADOS

4.1. Expresión de los receptores SLAM y proteínas adaptadoras en LT durante el desarrollo del lupus.

Resultados previos del laboratorio demostraron un incremento significativo en la expresión endógena de los receptores SLAM F1 y F6 en los LT del bazo de ratones lúpicos en comparación a LT de ratones controles (Fig. 2A, 3A). Por otro lado, la activación policlonal de LT CD4⁺ del bazo de ratones lúpicos, con anti-CD3 y anti-CD28, induce la expresión del receptor SLAM F6, observándose un incremento significativo en comparación a LT CD4⁺ del bazo de ratones controles (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner, 2013).

Sin embargo, durante la respuesta inmune, los linfocitos T son activados por células presentadoras de antígenos las cuales proveen de co-estimulación y factores solubles, variables ausentes en los experimentos mencionados con anterioridad. Por lo tanto nos preguntamos si la activación policlonal de linfocitos T CD4⁺ en presencia de células presentadoras de antígeno (APC), tales como células dendríticas o LB, afecta la expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en los LT CD4⁺. Por otro lado, este diseño experimental permitirá dilucidar si la alta expresión endógena de los receptores SLAM en ratones lúpicos se debe a su activación mediada por APCs. Para esto, LT vírgenes (LTv) obtenidos del bazo de un ratón lúpico se activaron con anti-CD3 por 5 días a 37°C en presencia de DCs o DCs y LB provenientes del bazo de ratones lúpicos y se evaluó la expresión de SLAM F1 y F6 en la población de LT CD4⁺.

El análisis de citometría de flujo de la Fig 2B muestra que la expresión de SLAM F1 en los LT CD4+ cultivados en presencia de anti-CD3 es idéntica a los LT no tratados. Cuando se agregan células dendríticas con o sin LB, SLAM F1 aumenta en los LT CD4+, tanto de ratones controles como lúpicos (Fig. 2B, C). Sin embargo el aumento de SLAM F1 en LT CD4+ provenientes de ratones lúpicos es significativamente menor ($p < 0,05$) comparado a LT CD4+ de ratones control (Figura 2C).

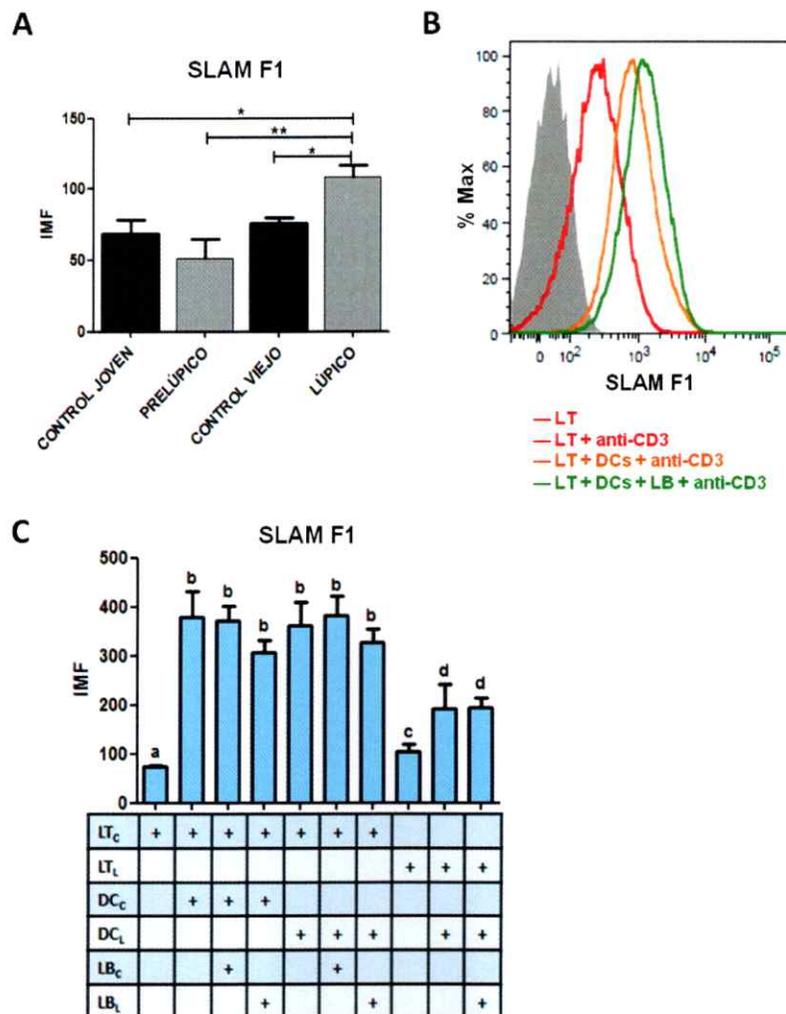


Figura 2. Expresión de SLAM F1 en LT CD4+ activados con anti-CD3 en presencia de DCs y/o LB. LT_v, DCs y LB de bazo de raúpicos (L) y controles (C) se purificaron por *cell sorting* y se cultivaron durante 5 días en una razón de 1 DC : 2 LT : 5 LB en presencia de

anti-CD3. **(A)** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) endógena de SLAM F1 en LT CD4+ del bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **(B)** Análisis de citometría de flujo representativo de la expresión de SLAM F1 en LT CD4+ activados con o sin anti-CD3, DCs y DCs/LB, en gris se muestra el control FMO. **(C)** Gráfico de barras muestra la IMF de SLAM F1 en LT CD4+ de ratones controles (C) y lúpicos (L) activados en presencia de anti-CD3 y células presentadoras de antígeno. Letras distintas indican diferencias significativas (a-b $p < 0,001$, a-c $p < 0,05$, c-d $p < 0,05$, b-d $p < 0,05$). Los datos se grafican como el promedio \pm error estándar y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para determinar si la baja expresión de SLAM F1 en LT CD4+ de ratones lúpicos era debido a la acción de APCs del mismo ratón, se activaron LT CD4+ de ratones controles con APCs obtenidas del bazo de ratones lúpicos para observar su posible efecto sobre la expresión de SLAM F1 en un contexto control. El análisis de citometría de flujo muestra (Fig. 2C) que la expresión de SLAM F1 en los LT CD4+ de ratones controles activados con anti-CD3 y APCs de ratones lúpicos no varía en comparación a la utilización de APCs de ratones controles. Dicho resultado indica que tanto APCs de ratones lúpicos como control presentan la misma capacidad para activar e inducir la expresión de SLAM F1 en LT CD4+. A su vez esto indicaría que la baja expresión de SLAM F1 en LT CD4+ de bazo de ratones lúpicos activados policlonalmente sería consecuencia de un fenotipo aberrante por parte de LT CD4+ más que por la interacción con las APC ó debido a la falta de otros factores involucrados no evaluados mediante esta estrategia experimental. En conjunto estos experimentos indicarían que el aumento en la expresión de SLAM F1 observada endógenamente en los ratones lúpicos no se debe a la activación por parte de DCs o LB.

Por otro lado se observó que la expresión de SLAM F6 aumenta en los LT CD4+, sean estos de ratones control ($p < 0,001$) o lúpicos ($p < 0,01$), luego de ser activados en presencia de anti-CD3 y sus respectivas APCs (Fig. 3B). Sin embargo, la expresión de SLAM F6 en LT CD4+ de ratones lúpicos activados en presencia de DCs y LB es mayor ($p < 0,05$) comparado a LT CD4+ de ratones controles (Fig. 3B). Para determinar si el aumento de expresión de SLAM F6 observada en LT CD4+ de ratones lúpicos activados en presencia de anti-CD3 y APCs era generada por la directa interacción con las APC de ratones lúpicos, se activaron LT CD4+ de ratones controles con APCs obtenidas del bazo de ratones lúpicos. El análisis de citometría de flujo muestra que la expresión de SLAM F6 en los LT CD4+ de ratones controles activados en presencia de anti-CD3 con DCs en presencia o ausencia de LB de ratones lúpicos no varía en comparación a LT CD4+ de ratones controles activados en presencia de anti-CD3 con APCs de ratones controles. Dicho resultado indicaría que APCs de ratones lúpicos no serían responsables del incremento en la expresión de SLAM F6 en LT CD4+ de ratones lúpicos en comparación a ratones controles. Finalmente, la interacción de APCs con LTV no logra explicar el aumento en SLAM F6 encontrado en LT CD4+ de ratones lúpicos.

Puesto que la expresión de algunos de los receptores SLAM está aumentada endógenamente en los linfocitos T CD4+ de ratones lúpicos y dado que éstos señalizan a través de las proteínas adaptadoras SAP, evaluamos la expresión mediante Western blot de esta proteína en LT CD4+ obtenidos del bazo de ratones controles y (NZB/W)F1 que han desarrollado lupus. Como se muestra en la Fig. 4, el análisis densitométrico reveló que no existen diferencias de expresión de SAP en LT de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles. La proteína adaptadora EAT-2 fue

también analizada en los LT y encontramos que éstos no expresan dicha proteína (datos no mostrados).

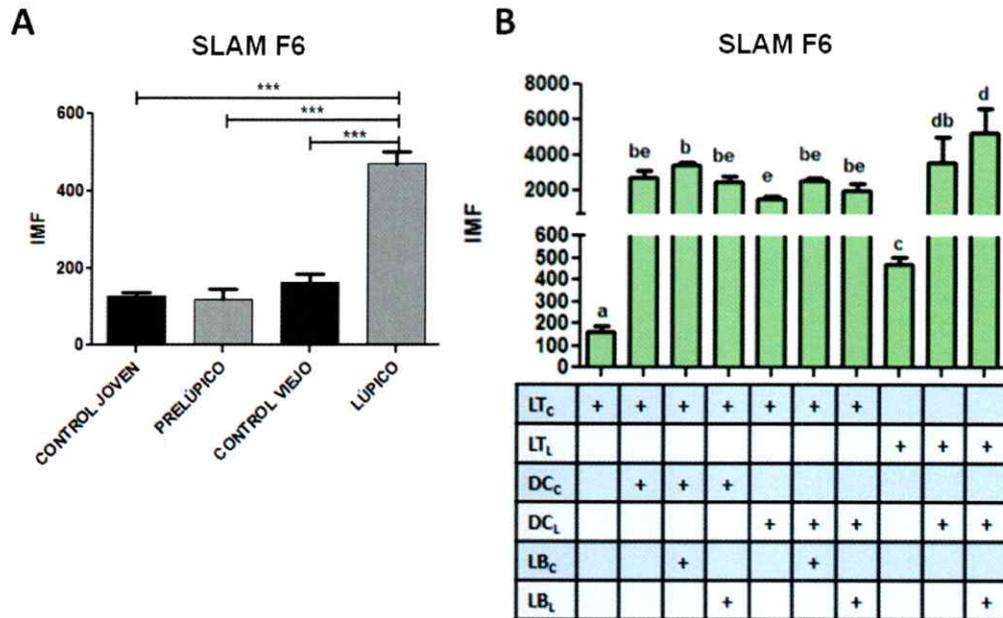


Figura 3. Expresión de SLAM F6 en LT CD4+ activados con anti-CD3 en presencia de DCs y/o LB. LT_v, DCs y LB de bazo de ratones lúpicos (L) y controles (C) se purificaron por *cell sorting* y se cultivaron durante 5 días en una razón de 1 DC : 2 LT : 5 LB en presencia de anti-CD3. **(A)** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) endógena de SLAM F6 en LT CD4+ del bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. *** p<0,001. **(B)** Gráfico de barras muestra la IMF de SLAM F6 en LT CD4+ de ratones controles (C) y lúpicos (L) activados en presencia de anti-CD3 y células presentadoras de antígeno. Letras distintas indican diferencias significativas a p<0,05. Los datos se grafican como el promedio ± error estándar y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

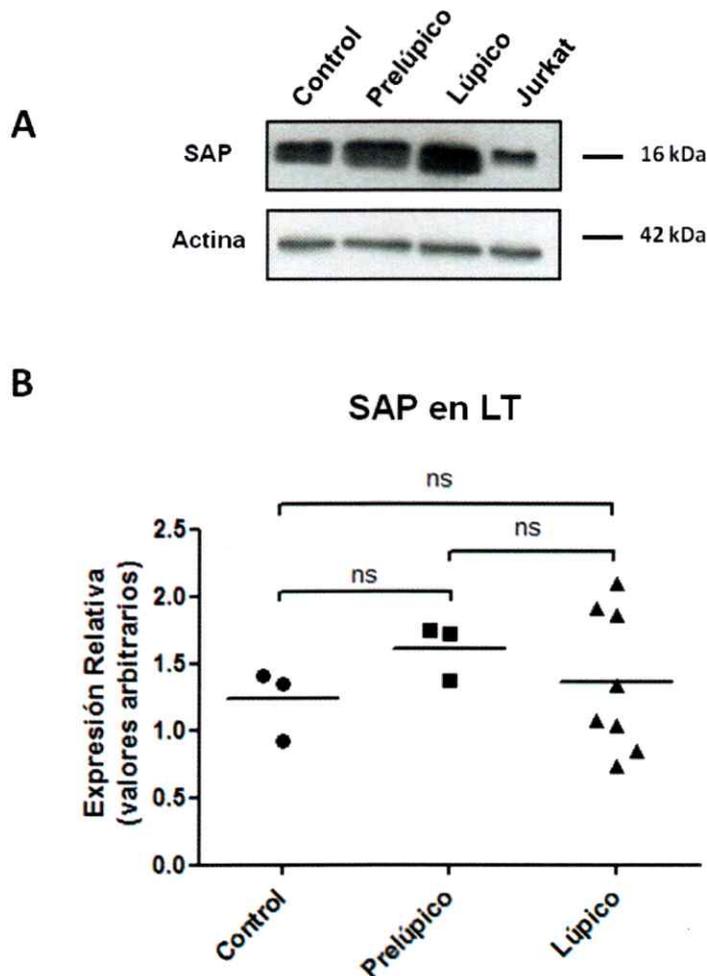


Figura 4. Expresión de SAP en linfocitos T de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. LT de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos se purificaron mediante *cell sorting* de acuerdo a la expresión de CD4, luego las células fueron lisadas y 20 µg de proteínas totales de LT y de lisado celular de células Jurkat (control positivo) fueron separados por SDS-PAGE al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde la proteína SAP se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-SAP. Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina. **(A)** Imagen representativa de al menos 3 experimentos de Western Blot, que ilustra los carriles correspondientes a SAP y actina (control de carga) en LT de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. **(B)** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de SAP observada mediante Western Blot. n=3 para controles, n=3 para pre-lúpicos, y n=8 para lúpicos. La línea horizontal indica el promedio. Los resultados fueron normalizados a la expresión de actina y son presentados relativos a la expresión de SAP en ratones controles. ns: no significativo.

4.2. Expresión de los receptores SLAM y proteínas adaptadoras en LB durante el desarrollo del lupus.

Resultados previos del laboratorio demostraron que LB de bazo de ratones lúpicos expresan elevados niveles de los receptores SLAM de forma endógena en comparación a ratones controles, específicamente SLAM F1 (Figura 5A). *In vivo* los linfocitos B junto con las células dendríticas interactúan con LT proporcionando co-estimulación y factores solubles. Por otra parte los LT son capaces de estimular a LB para iniciar la producción de anticuerpos, fenómeno interesante de estudiar en el contexto del lupus. Por lo tanto nos preguntamos si la interacción de LT y DCs con LB tendría un efecto en la expresión de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 en estos últimos. A partir del mismo co-cultivo de LTV con APCs presentado en la sección anterior se evaluó la expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en LB B220+ pasado 5 días post-cultivo.

El análisis de citometría de flujo muestra que el nivel de expresión (IMF) de SLAM F1 en LB, tanto de ratones controles como lúpicos, aumenta luego de interactuar con LT CD4+ activados en presencia de anti-CD3 y DCs provenientes del mismo ratón (Figura 5B). Sin embargo, dicho aumento es mayor en LB de ratones controles en comparación a aquellos provenientes de ratones lúpicos (Figura 5C). Para determinar si dicho déficit en el aumento de la expresión de SLAM F1 en LB de ratones lúpicos provenía de la interacción con LTV y DCs de ratones lúpicos, se analizó la expresión de este receptor en LB de ratones controles en aquellas condiciones donde se agregaron LTV y DCs de ratones lúpicos. El análisis por citometría de flujo determinó que LTV y DCs de ratones lúpicos no generan una

disminución significativa en el nivel de expresión (IMF) de SLAM F1 en LB de ratones controles (Figura 5C, gráfico a la izquierda), lo que indicaría que LB de ratones lúpicos intrínsecamente presentan una disminución en la inducción de la expresión de SLAM F1 en un contexto de co-estimulación o que existirían otros factores involucrados no presentes en este montaje experimental, por ejemplo, citoquinas secretadas por otros tipos celulares. Sin embargo, cabe mencionar que en estas condiciones la variabilidad de los datos fue mayor, por lo que no se encontraron diferencias significativas con la expresión de SLAM F1 en LB de ratones lúpicos cultivados en presencia de LTV y DCs de ratones lúpicos. Esto sugiere parcialmente que si existiría un efecto por parte de los LTV o DCs de ratones lúpicos sobre la inducción de la expresión de SLAM F1 en LB.

Por otro lado el análisis del nivel de expresión (IMF) de SLAM F6 no arrojó diferencias entre LB provenientes de ratones controles en comparación a ratones lúpicos luego de 5 días de co-cultivo (Figura 5D, gráfico a la izquierda). Al co-cultivar LB de ratones controles con LTV y DCs de ratones lúpicos no se observaron variaciones en la expresión de SLAM F6.

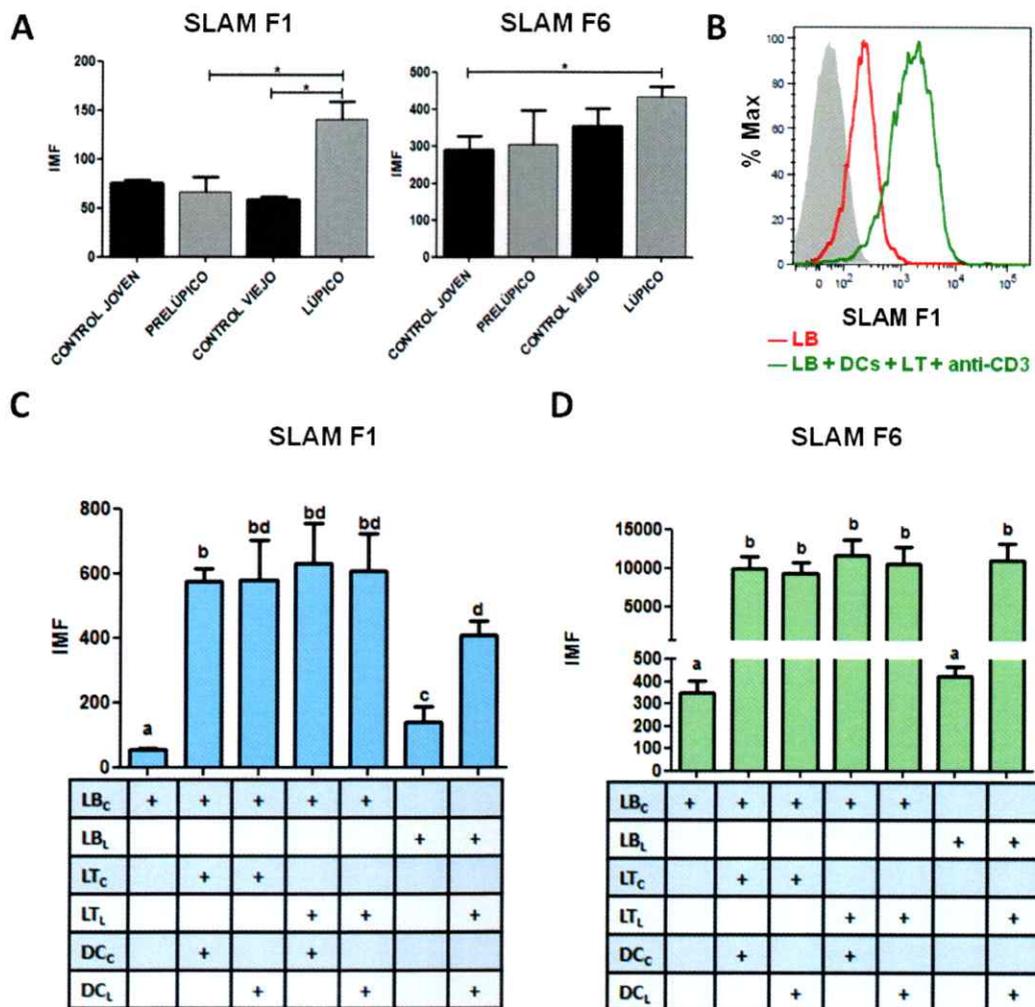


Figura 5. Expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en LB cultivados en presencia de DCs y LT CD4+ activados. LB, DCs y LTv de bazo de ratones lúpicos (L) y controles (C) se purificaron por *cell sorting* y se cultivaron durante 5 días en una razón de 1 DC : 2 LT : 5 LB en presencia de anti-CD3. **(A)** Gráficos de barras que muestran la intensidad media de fluorescencia (IMF) endógena de SLAM F1 y SLAM F6 en LB del bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. * $p < 0,05$ **(B)** Análisis de citometría de flujo representativo de la expresión de SLAM F1 en LB en presencia o ausencia de DCs y LT CD4⁺ activados con anti-CD3, en gris se muestra el control FMO. **(C)** Gráficos de barras muestra la IMF de SLAM F1 (izquierda) y SLAM F6 (derecha) en LB de ratones controles y lúpicos co-cultivados con DCs y LT CD4⁺ activados en presencia de anti-CD3. Los datos se grafican como el promedio \pm error estándar y son representativos de al menos tres experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

Análisis del porcentaje y número absoluto de LB de ratones controles y lúpicos posterior a los 5 días de co-cultivo muestran un aumento de la población de LB, tanto de ratones lúpicos y controles, en todas aquellas condiciones donde se incubaron LTV de bazo de ratones lúpicos en presencia de anti-CD3 y DCs (Fig. 6). Ya que estos cultivos se realizaron con el mismo número de LB tanto de ratones controles como lúpicos, este resultado sugiere que LT CD4+ de bazo de ratones lúpicos inducen la proliferación o sobrevida de LB. Dado que la población de LB expresan en su totalidad SLAM F1 y SLAM F6, sólo observándose diferencias en la intensidad de dicha expresión (IMF), el aumento del porcentaje de LB totales en los cultivos indica que en dichas condiciones existe un aumento de la población SLAM F1 y F6+. Lo que sugiere una compensación en cuanto a la disminución de la IMF.

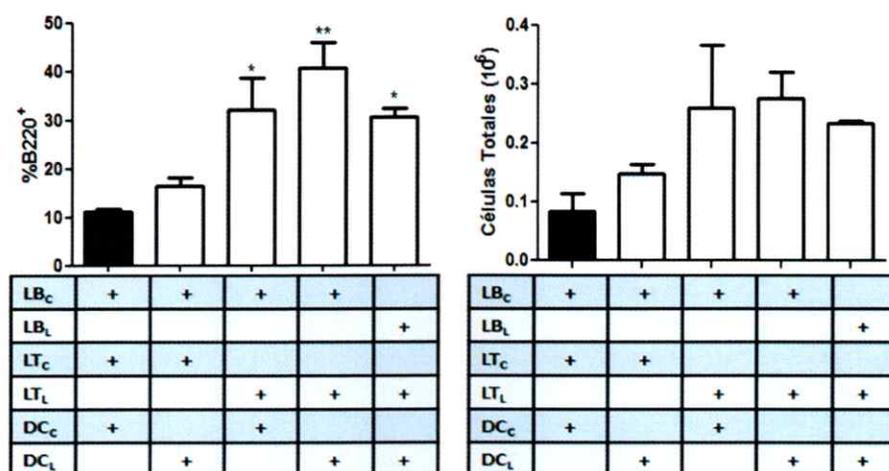


Figura 6. LTV CD4+ de ratones lúpicos promueven la proliferación de LB. LB, DCs y LTV de bazo de ratones lúpicos (L) y controles (C) se purificaron por *cell sorting* y se cultivaron durante 5 días en una razón de 1 DC : 2 LT : 5 LB en presencia de anti-CD3. Los gráficos de barras muestran el porcentaje y número absoluto de LB (B220+) cultivados en presencia de LTV CD4+ y DCs. Los datos se grafican como el promedio \pm error estándar y son representativos de al menos tres experimentos independientes. * p<0,05; ** p<0,01.

Debido a que la expresión de algunos de los receptores SLAM se encuentra aumentada endógenamente en los linfocitos B provenientes de ratones lúpicos (Fig. 5A) y dado que éstos señalizan a través de las proteínas adaptadoras SAP, evaluamos la expresión mediante Western blot de las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2 en LB obtenidos del bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles. Los datos obtenidos a través del análisis densitométrico de las bandas de expresión revelaron un aumento significativo ($p < 0,05$) de 2,7 veces los niveles de EAT-2 en linfocitos B provenientes del bazo de ratones lúpicos ($2,7 \pm 0,6$ vs. $1,0 \pm 0,1$ expresión relativa) en comparación con los controles y un aumento significativo de 2,3 veces ($2,3 \pm 0,6$ vs. $1,2 \pm 0,1$ expresión relativa) en comparación con ratones pre-lúpicos (Figura 7). No hubo diferencias significativas en la expresión de EAT-2 en LB entre ratones pre-lúpicos y controles.

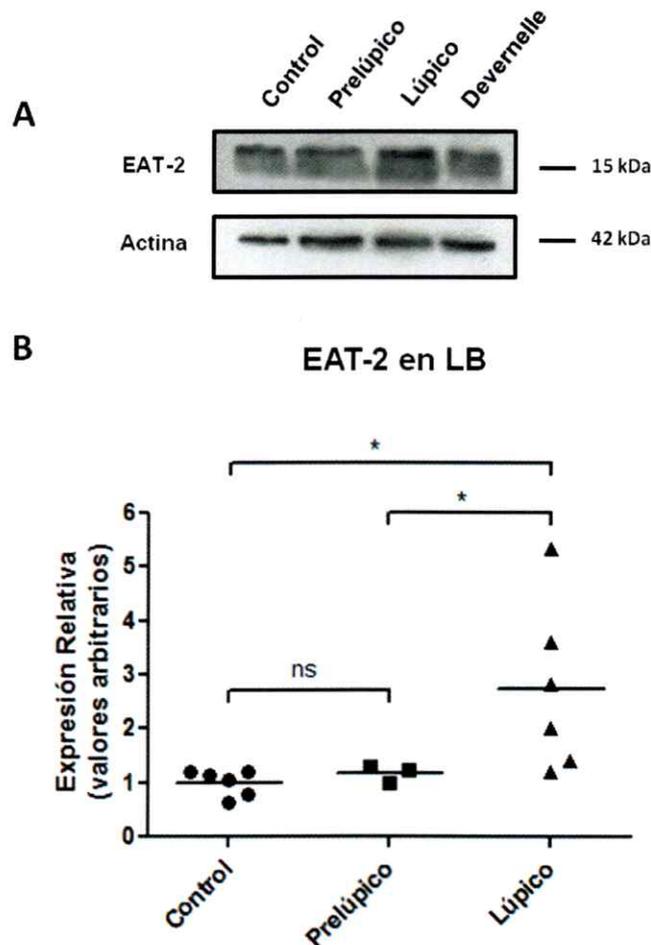


Figura 7. LB de bazo de ratones lúpicos sobreexpresan EAT-2 respecto a ratones pre-lúpicos y controles. LB de bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles se purificaron mediante *cell sorting* de acuerdo a la expresión de B220 y CD79b, luego las células fueron lisadas y 20 μ g de proteínas totales de LB y de lisado celular de células Devernelle (control positivo) fueron separados por SDS-PAGE al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde la proteína EAT-2 se detectó utilizando un anticuerpo policlonal anti-EAT-2. Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina. **(A)** Imagen representativa de al menos 3 experimentos de Western Blot, que ilustra los carriles correspondientes a EAT-2 y actina (control de carga) en LB de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. **(B)** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de EAT-2 observada mediante Western Blot. $n=6$ para controles, $n=3$ para pre-lúpicos, y $n=6$ para lúpicos. La línea horizontal indica el promedio. Los resultados fueron normalizados a la expresión de actina y son presentados relativos a la expresión de EAT-2 en ratones controles. * $p<0,05$; ns: no significativo.

Por otro lado, la proteína adaptadora SAP, caracterizada ampliamente en LT y células NK ha sido también identificada en pequeñas poblaciones de LB. Debido a esto, evaluamos la expresión de esta proteína en LB de ratones sanos y enfermos con lupus. Los datos obtenidos a través del análisis densitométrico de las bandas de expresión revelaron un aumento significativo ($p < 0,05$) 2,5 veces mayor en los niveles de SAP en linfocitos B provenientes del bazo de ratones lúpicos ($2,5 \pm 0,8$ vs. $1,0 \pm 0,2$ expresión relativa) en comparación con los controles y un aumento significativo de 1,8 veces más ($2,491 \pm 0,797$ vs. $1,376 \pm 0,282$ expresión relativa) en comparación con ratones pre-lúpicos (Figura 8). No hubo diferencias significativas en la expresión de SAP en LB entre ratones pre-lúpicos y controles. Estos resultados sugieren un aumento en la actividad de la vía SLAM/SAP lo que podría a su vez generar un incremento de las interacciones entre LB y otras células inmunes, específicamente LT que también expresan moléculas de la familia SLAM, lo que finalmente contribuiría a la inducción de la activación y proliferación de LB autorreactivos.

Tanto el aumento de SAP como de EAT-2 en LB lúpicos sugiere un rol determinante de estas moléculas en la activación y función de LB autorreactivos.

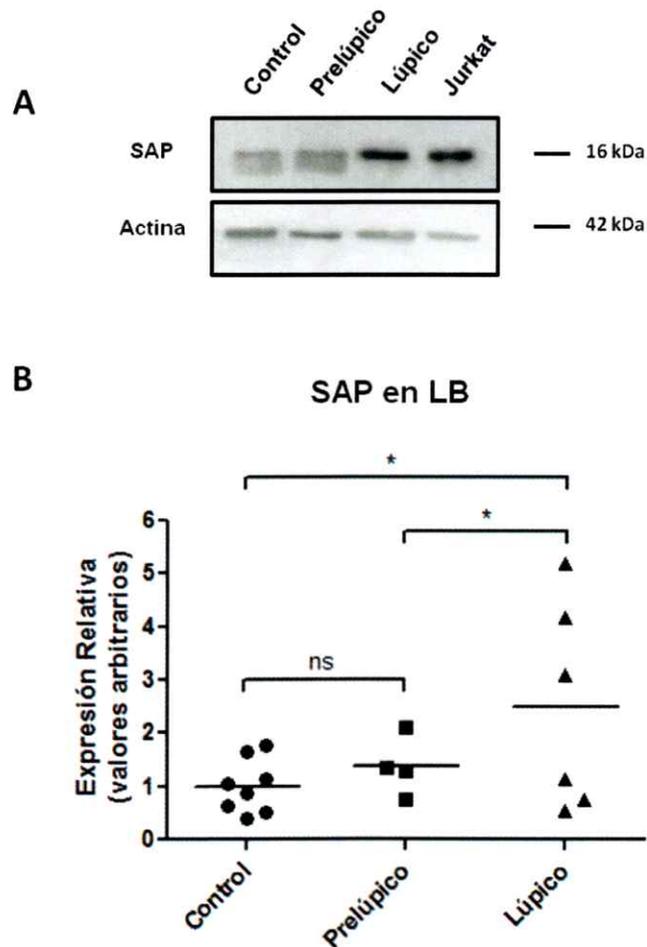


Figura 8. LB de bazo de ratones lúpicos sobreexpresan SAP en comparación a ratones pre-lúpicos y controles. LB de bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles se purificaron mediante *cell sorting* de acuerdo a la expresión de B220 y CD79b, luego las células fueron lisadas y 20 μ g de proteínas totales de LB y de lisado celular de células Jurkat (control positivo) fueron separados por SDS-PAGE al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde la proteína SAP se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-SAP. Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina. **(A)** Imagen representativa de al menos 3 experimentos de Western Blot, que ilustra los carriles correspondientes a SAP y actina (control de carga) en LB de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. **(B)** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de SAP observada mediante Western Blot. $n=8$ para controles, $n=4$ para pre-lúpicos, y $n=6$ para lúpicos. La línea horizontal indica el promedio. Los resultados fueron normalizados a la expresión de actina y son presentados relativos a la expresión de SAP en ratones controles. * $p<0,05$; ns: no significativo.

4.3. Expresión de proteínas adaptadoras asociadas a SLAM en células dendríticas durante el desarrollo del lupus.

Las células dendríticas cumplen un importante rol en la respuesta inmune y también en procesos de autoinmunidad. Cambios en el fenotipo y número de las distintas sub-poblaciones de DCs han sido implicados en la patogénesis del lupus. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que durante el desarrollo del lupus en el modelo murino (NZW/B)F1 existe una desregulación en la composición de distintas sub-poblaciones de DCs en el bazo, produciéndose un incremento en el número de DCs plasmacitoides (pDC) en el bazo de ratones lúpicos. Análisis de los niveles de expresión de los distintos receptores SLAM, tanto en DC convencionales (cDC) como pDC, demostraron que cDC de bazo de ratones lúpicos sobreexpresan SLAM F1 en comparación a ratones pre-lúpicos o control (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner, 2013). Por otro lado pDC de bazo de ratones lúpicos presentan una mayor expresión de SLAM F6 en comparación a ratones pre-lúpicos (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner, 2013). Dado que SLAM señala mediante los adaptadores SAP, nos preguntamos si la expresión de dichas proteínas río abajo de la cascada de señalización podrían verse afectadas durante el desarrollo del lupus. Se analizó mediante Western blot la expresión de la proteína adaptadora EAT-2 en lisado de cDC y pDC purificadas mediante *cell sorter* de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos.

La intensidad relativa de EAT-2 en la sub-población de células dendríticas convencionales se muestra en la Figura 9A. Los niveles de la proteína adaptadora

se encontraron aumentados significativamente 2,6 veces en cDC provenientes de ratones lúpicos ($2,6 \pm 0,7$ vs. $1,0 \pm 0,3$ expresión relativa) en comparación a ratones control y un aumento significativo de 2,5 veces en cDC de ratones pre-lúpicos ($2,5 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,3$ expresión relativa) en comparación con ratones controles. No se encontraron diferencias de expresión de EAT-2 entre cDC de ratones lúpicos y pre-lúpicos, lo cual sugiere que las diferencias observadas en la expresión de EAT-2 en cDC no está relacionado con el desarrollo de la enfermedad. El patrón de expresión de EAT-2 en células dendríticas plasmacitoides no fue significativamente diferente entre los distintos grupos de ratones analizados (Figura 9B). La expresión de SAP fue además evaluada en cDC y pDC, encontrándose que ninguna de éstas sub-poblaciones de DCs lo expresa (datos no mostrados), lo cual concuerda con lo establecido en la literatura.

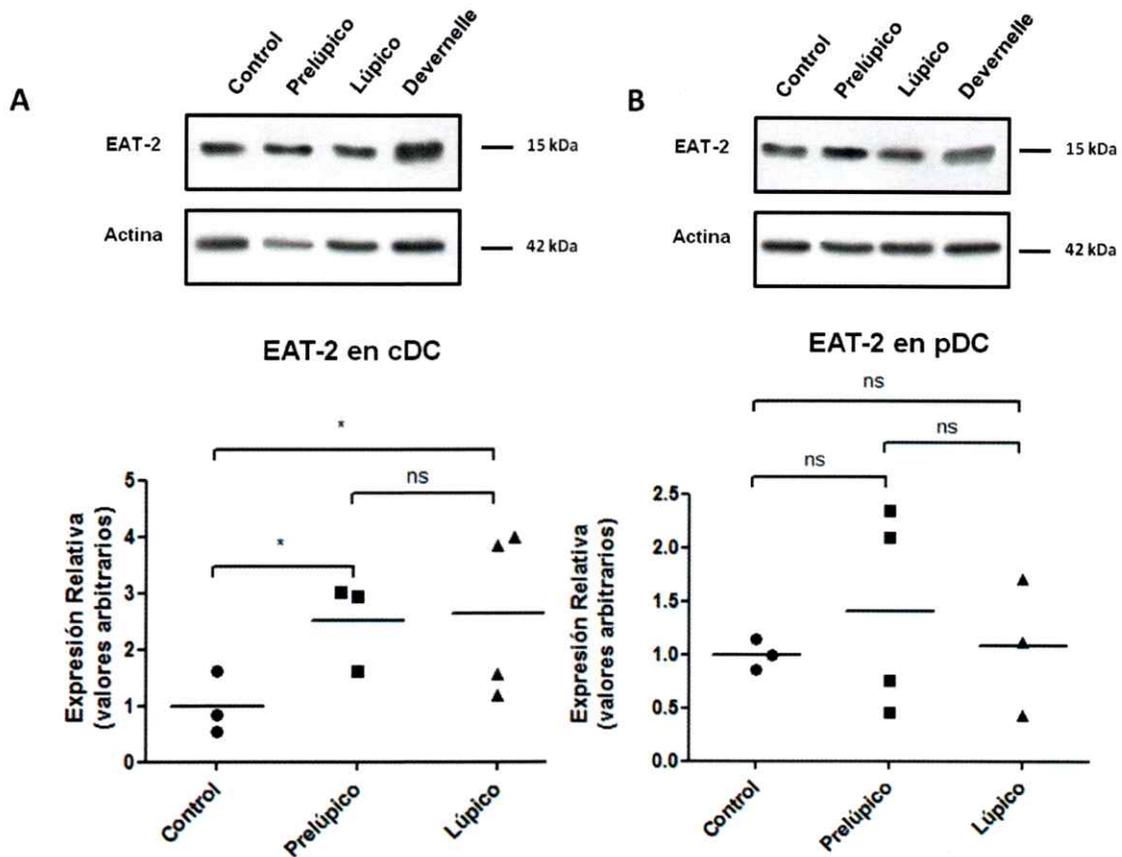


Figura 9. Expresión de EAT-2 en cDC y pDC de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. cDC (B220⁻CD11c⁺) y pDC (B22⁺CD11c⁺) de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos se purificaron mediante *cell sorting*, luego las células fueron lisadas y 20 µg de proteínas totales de cDC y pDC y de lisado celular de células Devernelle (control positivo) fueron separados por SDS-PAGE al 12%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde la proteína EAT-2 se detectó utilizando un anticuerpo policlonal anti-EAT-2. Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina. **(A)** Imagen representativa de al menos 3 experimentos de Western Blot, que ilustra los carriles correspondientes a EAT-2 y actina (control de carga) en cDC (izquierda) y pDC (derecha) de bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles. **(B)** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de EAT-2 en cDC y pDC observada mediante Western Blot. n=3 para controles, n=3 para pre-lúpicos, y n=4 para lúpicos. La línea horizontal indica el promedio. Los resultados fueron normalizados a la expresión de actina y son presentados relativos a la expresión de EAT-2 en ratones controles. * p<0,05; ns: no significativo.

5. DISCUSIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multifactorial de etiología aún desconocida. Diversos estudios en pacientes con lupus y en cepas congénicas murinas han identificado más de 100 loci asociados con alguna de las manifestaciones observadas en la enfermedad (Morel y col., 2001). El locus Sle1b, localizado en el cromosoma 1 murino y humano, codifica para proteínas receptoras de la familia SLAM. Los receptores SLAM son expresados en una amplia gama de células del sistema inmune, además cada tipo celular expresa uno o más de los 9 receptor(es) lo que contribuye en la generación de múltiples interacciones célula-célula. Durante la sinapsis inmunológica la familia de receptores de superficie SLAM cumple funciones co-estimuladoras entre linfocitos y células presentadoras de antígeno (APC) u otras células del sistema inmune. En el caso de los LT, la interacción entre receptores SLAM gatilla el reclutamiento de proteínas adaptadoras de la familia SAP, las cuales reclutan tirosinas quinasas que fosforilan SLAM iniciándose la señalización que culmina con la transcripción de IL-4. Evidencias recientes han sugerido un rol crucial de estos receptores en el desarrollo de autoinmunidad (Chan y col., 2006).

En el presente seminario de título se evaluó la expresión de ciertos receptores SLAM y sus proteínas adaptadoras en linfocitos T, linfocitos B y dos subpoblaciones específicas de células dendríticas en ratones de la cepa (NZB/W)F1, durante el desarrollo de la enfermedad.

5.1. Expresión alterada de los receptores SLAM F1 y SLAM F6 en los LT de ratones lúpicos.

Los linfocitos T comprenden un componente crucial del sistema inmune adaptable y proveen de múltiples funciones tanto efectoras como regulatorias. La activación de un LT gatilla múltiples cascadas de señalización que generan la activación y reclutamiento de células del sistema inmune, liberación de citoquinas, modulación de la respuesta humoral por parte de los LB, entre otras funciones efectoras. Anormalidades funcionales en LT son capaces de generar amplias desregulaciones en el sistema inmune, dando origen a distintas patologías. Variados estudios y análisis tanto en pacientes con lupus como en modelos murinos de la enfermedad sugieren un gran protagonismo de los LT en la patogénesis del LES, específicamente debido a la interacción positiva que tendrían con LB autorreactivos (Kamperschroer y col., 2008). A la fecha existe una gran cantidad de estudios en los cuales se han identificado diferentes defectos en la funcionalidad de LT en el lupus (Moulton & Tsokos, 2011). La disfuncionalidad de los LT en esta enfermedad se encuentra determinada por un conjunto de anormalidades tanto moleculares como celulares, donde se han descrito desregulaciones en la producción de ciertas citoquinas, observándose un aumento de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-21, IL-17 y una disminución de IL-2 y TGF- β (Ohl & Tenbrock, 2011; Dean y col. 2000). Por otra parte se ha observado una disminución en la expresión de la cadena CD3 ζ del TCR en varios pacientes con lupus (Moulton & Tsokos, 2011). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que LT CD4⁺ de ratones lúpicos sobre-expresan SLAM F1 y SLAM F6 de forma endógena. Por otra parte, se ha demostrado que la activación de LT aumenta la expresión de los receptores SLAM en éstos, lo que

sugiere que la vía SLAM/SAP modula funciones efectoras (Engel y col., 2003; Mehrle y col., 2005). Los resultados de este trabajo concuerdan con lo anterior dado que observamos un aumento de SLAM F1 en LTv activados de manera policlonal en presencia de APCs. Sin embargo, los LT CD4+ de ratones lúpicos presentan una menor inducción de SLAM F1 comparado a LT CD4+ de ratones controles, lo cual se correlaciona con resultados anteriores del laboratorio obtenidos mediante activación con α -CD3/28 en ausencia de APCs (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner).

SLAM F1 regula la diferenciación TH2 modulando la producción de IL-4 en LT e inhibiendo la vía que conduce hacia la producción de IFN- γ , citoquina característica de linfocitos TH1 (Howie D. y cols., 2002 a). Debido a esto, ratones knock-out para SLAM F1 o SAP muestran un aumento en la producción de IFN- γ y una deficiencia en IL-4 por parte de linfocitos T (Czar y col., 2001; Hron y col., 2004). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que LT CD4+ de ratones lúpicos producen significativamente más IFN- γ en comparación a LT CD4+ de ratones pre-lúpicos o controles (Gleisner y col., 2013), lo cual podría estar directamente relacionado con la menor capacidad de inducir SLAM F1 encontrado en LT CD4+ de ratones lúpicos activados. Sin embargo, la expresión endógena de SLAM F1 en ratones lúpicos es mayor que en ratones controles, lo que sugiere que otros receptores estarían involucrados en el aumento de IFN- γ , por ejemplo SLAM F6. Por otra parte, la baja expresión de este receptor SLAM en LT CD4+ activados de ratones lúpicos podría deberse a que éstos últimos se encontrasen exhaustos, condición que conlleva a una falta de funcionalidad y pérdida de la actividad inmune tal como se ha observado en LT posterior a una infección crónica (Wherry 2011). Sin embargo se requieren nuevos experimentos para determinar el nivel de

desregulación de la vía SLAM F1 en LT de ratones lúpicos debido a que la falta de expresión de uno de los receptores no implica que toda la vía se vea afectada. Se ha determinado que la falta individual de ciertos receptores SLAM en células del sistema inmune murino genera fenotipos patológicos más leves, indicando la presencia de una redundancia funcional entre distintos receptores de esta familia (Dong & Veillette, 2010). En concordancia con esto encontramos que LTv de ratones lúpicos activados policlonalmente en presencia de DCs aumentan significativamente la expresión de SLAM F6 en comparación a LT. de ratones controles.

El receptor SLAM F6 ha sido implicado en la generación de citoquinas tipo TH1, como IFN- γ , molécula que se encuentra aumentada en pacientes con lupus o modelos murinos de LES (Ohl & Tenbrock, 2011). Los experimentos realizados muestran un aumento considerable del receptor SLAM F6 en LT CD4+ de ratones lúpicos posterior a la activación por DCs y anti-CD3, lo que podría correlacionarse directamente con el aumento de IFN- γ encontrado previamente en estos ratones (Gleisner y col. 2013). Estudios recientes en humanos han corroborado los resultados obtenidos en el modelo murino aquí estudiado, donde se encontró una expresión aumentada de los receptores SLAM F3 y SLAM F6 en la superficie de linfocitos T de pacientes con lupus en comparación con células de donantes sanos (Chatterjee y col. 2012). Por otro lado se ha observado que SLAM F6 en LT CD4+ podría tener una capacidad co-estimuladora mayor en comparación a la activación por anti-CD28, específicamente durante la interacción con LT CD8+ (Chatterjee y col. 2012). El aumento de expresión de SLAM F6 en LT CD4+ de ratones lúpicos activados con anti-CD3 en presencia de DCs indica un posible rol de este receptor

en la hiperactividad descrita en LT de ratones lúpicos y por ende en la patogénesis de la enfermedad.

Se ha descrito que interacciones homotípicas entre LT son capaces de generar señales secundarias mediadas por las interacciones homofílicas del receptor SLAM F6 y el reclutamiento río abajo de las proteínas adaptadoras SAP gatillando la expansión y diferenciación del linaje celular de linfocitos *T Natural Killer* (NKT) (Griewank K y col., 2007). Las células NKT son un grupo heterogéneo de linfocitos T que comparten propiedades tanto de LT como de células *Natural Killer* (NK). En el modelo murino (NZB/W)F1 la progresión de la enfermedad ha sido correlacionada con una elevada frecuencia de linfocitos NKT y con un aumento en la producción de IFN- γ por parte de estas células (Rymarchyk y col., 2008). El hallazgo de un aumento superior de la expresión de SLAM F6 en LT CD4+ de ratones lúpicos activados en comparación a LT CD4+ de ratones controles podría explicar el incremento en NKT observado durante el desarrollo de lupus en el modelo murino utilizado.

Con la finalidad de determinar el rol de las DCs y LB de fenotipo lúpico en la expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en LT CD4+, se activó LTV de ratones controles con APCs de ratones lúpicos. Observamos que las APCs de ratones lúpicos no producen una disminución de SLAM F1 o aumento de SLAM F6 como observamos en LT CD4+ de ratones lúpicos. Este resultado sugiere que las diferencias encontradas en ratones lúpicos serían intrínseca a los LT CD4+ de ratones lúpicos y no a las interacciones con las principales células presentadoras de antígeno. Estos

resultados también sugieren que el microambiente del bazo podría tener un rol importante en la expresión de los receptores SLAM.

La familia de receptores SLAM cumple funciones co-estimuladoras cuya actividad se encuentra mediada en parte por las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2 asociadas a éstas. Los análisis densitométricos de las bandas obtenidas mediante Western blot indican que no existen diferencias significativas de la expresión de la proteína SAP entre LT provenientes del bazo de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles. Dicho resultado sugiere que la desregulación encontrada en los receptores SLAM en LT de ratones lúpicos podría ser independiente de la señalización vía SAP. Sin embargo cabe resaltar que SAP fue analizado en LT CD4+ totales no activados, por lo que se requiere evaluar dicha expresión en LT CD4+ bajo condiciones de activación, para observar si existen o no diferencias en la regulación de la expresión de dicho adaptador en LT CD4+ de ratones lúpicos. Además de esto, la vía de señalización SLAM/SAP en LT CD4+ consiste de varios pasos donde uno de los importantes actores consta de proteínas quinasas tipo Src, como Fyn y Lck, cuyo rol es fosforilar residuos de tirosina encontrados en la cola citoplasmática de SLAM luego de las interacciones homotípicas o heterotípicas de los receptores SLAM (Howie y col. 2002 b). Para determinar el rol de la vía SLAM/SAP se hace necesario estudiar la expresión de otras proteínas clave de esta ruta. En acuerdo con otros estudios (Cannons y col., 2011) no se observó expresión de la proteína EAT-2 en LT CD4+ de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles (datos no mostrados).

En resumen, el aumento de SLAM F6 como la disminución de SLAM F1 en LT de ratones lúpicos activados policlonalmente en presencia de APCs, sugieren que la vía de señalización SLAM estaría involucrada en los procesos de autoinmunidad observadas en lupus.

5.2. LT de ratones lúpicos aumentan la expresión de SLAM F6 y SLAM F1 en LB e inducen su proliferación.

Los linfocitos B cumplen un rol vital en el sistema inmune debido a sus múltiples funciones, tales como producción de anticuerpos, presentación de antígenos, activación de LT, inhibición de LT reguladores, secreción de citoquinas y quimioquinas, entre otras (Dörner y col., 2009). Debido a esto, la desregulación o disfuncionalidad de LB puede conllevar a la generación y/o amplificación de respuestas autoinmunes (Sanz & Lee, 2010; Dörner y col., 2011). Dicha población linfocitaria ha sido implicada como la principal causante de los síntomas observados durante LES debido a su rol durante el quiebre de la tolerancia y la producción de autoanticuerpos. Diversos estudios sugieren la existencia de anomalías intrínsecas en LB asociados a esta enfermedad, como la baja expresión del receptor inhibitorio FcγRIIB, cuya pérdida induce autoinmunidad (Dörner y col., 2011). En el presente seminario estudiamos la participación de las moléculas pertenecientes a la familia SLAM y sus adaptadores en LB durante el desarrollo del lupus.

La activación de LB CD19+ humanos con acetato de forbol miristato (PMA) induce una alta expresión del receptor SLAM F1 (Romero y col., 2004). Otros métodos de activación, como el uso de anticuerpos anti-Ig o anti-CD40 también

gatillan la expresión de SLAM F1 en linfocitos B humanos y murinos (Mikhailap y col. 2004; Punnonen y col. 1997). Nuestros resultados indican que la estimulación de LB con LT CD4+ activados con anti-CD3 y DCs induce un aumento en la expresión de SLAM F1. Sin embargo LB de ratones lúpicos muestran un nivel de expresión menor de SLAM F1, lo cual podría sugerir que LB de ratones lúpicos presentarían defectos en la vía de señalización mediante SLAM F1. Sin embargo, cabe recalcar que el porcentaje de LB totales es mayor en ratones lúpicos cultivados con LT y DCs en comparación a LB de ratones controles bajo las mismas condiciones de cultivo. De este modo a pesar de la menor expresión de SLAM F1, al haber un mayor número de LB totales existiría una mayor probabilidad de contacto entre LT y LB a través de los receptores SLAM.

Un estudio reciente caracterizó la expresión del receptor SLAM F1 en distintas sub-poblaciones de linfocitos B humanos, según su órgano de procedencia y su estado de maduración (De Salort y col., 2010). De Salort y col. encontraron que células plasmáticas del bazo presentan una significativa reducción de la expresión de SLAM F1 en comparación a linfocitos B vírgenes. La disminución del nivel de expresión, medido a través de la IMF, de este receptor observada en LB de ratones lúpicos podría correlacionarse con los hallazgos de De Salort y col., lo cual indicaría que LB provenientes de un ratón lúpico se encontrarían en un estado de maduración final, dada su baja expresión de SLAM F1, correlacionado con la hiperactividad y amplio rol de estas células en la patogénesis del lupus.

El locus de susceptibilidad del cromosoma 1 del ratón, en donde se encuentra el gen que codifica para el receptor SLAM F6, ha sido asociado con la producción

de autoanticuerpos contra cromatina y como consecuencia la pérdida de tolerancia de LB a autoantígenos sub-nucleosomales (Kumar y col., 2006). En este trabajo se encontró que la expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en los LB aumenta en presencia de LT. Dicho resultado sugiere fuertemente que los LT CD4+ durante el lupus inducen la expresión de receptores SLAM en LB, posibilitando así una mayor interacción célula-célula. Además de esto se encontró un aumento en el porcentaje de LB totales, tanto lúpicos como controles, cuando éstos fueron estimulados con LT CD4+ de bazo de ratones lúpicos. Por lo tanto los LT de ratones lúpicos producirían la activación y proliferación de LB. En concordancia con esto, la producción de anticuerpos antígeno específico por parte de LB es LT-dependiente. La principal señal co-estimuladora en dicha interacción está mediada por la unión de CD40L en la superficie de LT con CD40 en la superficie de LB. Se ha descrito que pacientes con lupus presentan LT con altos niveles de expresión de la molécula CD40L, lo que generaría un efecto hiperestimulador en los LB (Desai-Mehta y col., 1996).

El estudio de la vía de señalización SLAM se ha enfocado específicamente en determinar su rol durante la activación de LT y células NK. Sin embargo, se ha descrito que la generación y mantención de la inmunidad humoral de largo plazo, la cual está mediada por LB, requiere de la participación activa de señales vía SLAM (Schwartzberg y col., 2009). Por otra parte, Hron y col. demostraron que la deficiencia de SAP en ratones les otorgaba protección ante la inducción de lupus mediante inyección de pristano (Hron y col. 2004). En dicho estudio se determinó que la falta de SAP inducía una deficiencia en la respuesta inmune humoral mediada por LT, determinando así que ciertos miembros de la familia SLAM/SAP

estaban involucrados en la patogénesis de enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos. En este trabajo determinamos que LB de ratones lúpicos poseen un aumento en la expresión de SAP y EAT-2 endógena en comparación con LB de ratones pre-lúpicos y controles. El aumento de la expresión de ambas proteínas en LB de ratones lúpicos y no en LB de ratones pre-lúpicos sugiere una real participación de las moléculas adaptadoras de SLAM durante el desarrollo de la enfermedad. El aumento de ambos adaptadores podría estar modulando las interacciones célula-célula entre LT-LB y DC-LB lo que se correlacionaría con la hiperactividad de LT y LB observados en esta enfermedad. Además de esto, Aldhamen y col. confirmaron que la sobre-expresión de EAT-2 en células presentadoras de antígeno gatilla la inducción de los marcadores de co-estimulación CD40, CD80, CD86 y MHC-II, lo que como consecuencia conlleva a un aumento en la activación de LT (Aldhamen y col., 2011).

Tanto el aumento de SLAM F6, como el de las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2 sugieren que éstas se encontrarían involucradas en el aumento de la proliferación y diferenciación de LB autorreactivos durante el desarrollo del lupus.

Cabe resaltar la importancia de evaluar aquella condición donde se activaron LTv CD4+ de ratones lúpicos con DCs y LB de ratones lúpicos, dado que se emula un contexto fisiológico respecto a las células que se encuentran interactuando en el bazo de un ratón lúpico. Tomando esto en consideración podemos inferir que durante el desarrollo del LES en el modelo murino (NZB/W)F1, la activación de LT CD4+ genera un aumento en la expresión de SLAM F6 y a la vez una disminución de SLAM F1, induciendo posiblemente una diferenciación tipo TH1. Por otro lado la

interacción de LT CD4+ con LB induciría en éstos últimos su proliferación. A su vez, la inducción de SLAM F6 en ambas poblaciones aumentaría las interacciones heterotípicas entre éstas generando una mayor estimulación retroactiva que podría culminar en una mayor población de LB autorreactivos, aumentando así los fenómenos de autoinmunidad observados en el lupus.

5.3. Proteínas adaptadoras de SLAM, SAP y EAT-2, en DCs no contribuyen al desarrollo del lupus.

Las células dendríticas (DCs) son otro gran componente del sistema inmune el cual se ha visto implicado en el desarrollo del LES. Además de su rol central en la respuesta inmune como principal célula presentadora de antígeno, las DCs participan activamente en la mantención de la tolerancia periférica. Dicha función ha sido corroborada al observar que la depleción de DCs interrumpe el fino equilibrio entre inmunidad y tolerancia generando autoinmunidad espontánea (Fransen y col., 2010). Las DCs pueden ser subdivididas principalmente en dos subgrupos según su fenotipo y funciones específicas, las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y convencionales (cDC). Las pDC han sido relacionadas con la inmunopatogénesis del LES debido a su capacidad de producir IFN- α , una citoquina pleiotropica que se encuentra en altos niveles en pacientes con lupus y modelos murinos de la enfermedad (Niewold y col., 2010). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la existencia de un aumento significativo de la sub-población de pDC en ratones lúpicos de la cepa (NZB/W)F1 (Jorgensen y col., 2010) además de un incremento en la expresión de SLAM F3 y SLAM F6 en estas células en condiciones basales (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner). Teniendo como antecedente dichos

datos se decidió inquirir en la expresión de proteínas río abajo de la vía de señalización de SLAM tanto en pDC y cDC. EAT-2 es una proteína adaptadora de la vía SLAM que ha sido descrita anteriormente en macrófagos, LB y DCs (Veillette, 2006 b). Mediante análisis de Western blot se determinó por primera vez la expresión de EAT-2 en sub-poblaciones de DCs murinas, indicando que tanto pDC y cDC expresan dicha proteína. Dichos resultados no han sido descritos anteriormente en la literatura y permiten corroborar que la vía SLAM en ambas sub-poblaciones de DCs podría estar mediada por EAT-2. Al analizar la expresión de esta proteína en pDC de ratones lúpicos, pre-lúpicos y controles no se encontraron diferencias significativas que pudieran indicar un rol de EAT-2 en pDC durante el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado las diferencias significativas encontradas en la expresión de EAT-2 entre cDC de ratones controles con cDC de ratones pre-lúpicos y lúpicos sugiere diferencias intrínsecas al modelo murino (NZB/W)F1. A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en la expresión de EAT-2 durante el desarrollo de la enfermedad, el aumento de la expresión de ciertos receptores SLAM encontrado anteriormente (Tesis Doctoral Alejandra Gleisner) sugiere que las DCs de ratones lúpicos podrían estar involucradas en la hiperactividad de LT al generar una sobre estimulación gracias a estos receptores, lo que a su vez generaría interacciones más fuertes entre LT y LB gatillando la producción de autoanticuerpos.

La falta de nuevas terapias para tratar el LES demuestra la falta de información y conocimientos respecto a esta enfermedad. Las terapias focalizadas en tratar componentes específicos del sistema inmune involucrados han sido limitadas dada la complejidad de esta patología, debido a esto la gran mayoría de las terapias

utilizan drogas inmunosupresoras de amplio espectro. El descubrimiento de nuevas moléculas, proteínas o incluso vías de señalización que estén involucradas en el desarrollo del lupus proveen nuevos conocimientos que constituyen una gran oportunidad para la creación de terapias específicas o de bio-marcadores para monitorear la actividad de la enfermedad.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este seminario de título permitieron esclarecer y corroborar el rol de ciertos miembros de la familia de receptores SLAM y las proteínas adaptadoras asociadas a éstos durante el desarrollo del Lupus Eritematoso Sistémico en el modelo murino (NZB/W)F1. En este trabajo se demostró la presencia de una desregulación de la expresión de los receptores SLAM F1 y SLAM F6, en linfocitos T y B provenientes de ratones lúpicos de la cepa (NZB/W)F1. Además se logró determinar la presencia de una elevada expresión de los adaptadores EAT-2 y SAP en linfocitos B provenientes de bazo de ratones lúpicos. Ambos resultados cumplen con los objetivos planteados, con lo cual se demuestra en parte la hipótesis. De esta manera se determina que el aumento de expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización de co-estimulación SLAM/SAP cumple un posible rol durante el desarrollo y mantención del fenotipo lúpico en ratones (NZB/W)F1. Como corolario de lo anterior, los resultados sugieren que ratones lúpicos aumentan la señalización vía SLAM, lo que le otorgaría a las células del sistema inmune una mayor capacidad de interacción, aumentando así la estimulación, proliferación, diferenciación e hiperactividad de ciertos linfocitos autorreactivos. A su vez, se generan nuevas interrogantes respecto al nivel de desregulación de esta vía de señalización en células del sistema inmune durante el desarrollo del lupus.

En resumen los resultados más importantes de este seminario de título son:

- LT CD4+ de ratones lúpicos activados con anti-CD3 en presencia de APCs presentan una baja expresión de SLAM F1 en comparación a LT CD4+ de ratones controles.
- LT CD4+ de ratones lúpicos sobre-expresan SLAM F6 luego de ser activados con anti-CD3 en presencia de APCs.
- APCs de ratones lúpicos y control presentan la misma capacidad para activar e inducir la expresión de SLAM F1 y SLAM F6 en LT CD4+ de ratones controles.
- LT CD4+ de ratones lúpicos inducen una mayor proliferación y expresión de SLAM F6 y SLAM F1 en LB de ratones lúpicos y controles.
- LB de ratones lúpicos sobre-expresan SAP y EAT-2 en comparación a LB de ratones pre-lúpicos o controles.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A.K. y Lichtman A.H. (2004) *Inmunología celular y molecular*. J.M. Igea y P. Engel (eds.). Elsevier España, Madrid. pp 3-6, 216-219, 411-417.
- Aldhamen YA, Appledorn DM, y col. (2011) Expression of the SLAM family of receptors adapter EAT-2 as a novel strategy for enhancing beneficial immune responses to vaccine antigens. *Journal of Immunology*. 186:722-32.
- Bloch-Queyrat C., Fondaneche M., Chen R. y col. (2005) Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *The Journal of Experimental Medicine*. 202 (1): 181-192.
- Calpe, S., N. Wang, y col. (2008). The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology* 97: 177-250.
- Cannons, J. L., L. J. Yu, y col. (2004). SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* 21(5): 693-706.
- Cannons J.L., Tangye S.G., Schwartzberg P.L. (2011) SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity. *Annual Review of Immunology*. 29: 665-705.
- Carroll, M.C. (2004). A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Immunology* (10): 825-31.
- Chan, A. Y., J. M. Westcott, y col. (2006). The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 18(6): 656-64.
- Chatterjee M. Y col. (2012) Increased expression of SLAM receptors SLAMF3 and SLAMF6 in systemic lupus erythematosus T lymphocytes promotes Th17 differentiation. *Journal of Immunology*. 188(3):1206-12.
- Czar M.J., Kersh E.N., Mijares L.A. y col. (2001) Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7449-7454.
- De Salort J. y col. (2011) Expression of SLAM (CD150) cell-surface receptors on human B-cell subsets: From pro-B to cells. *Immunology Letters*. 134(2): 129-136.
- Dean G. y col. (2000) Cytokines and systemic lupus Erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 59 (4): 243-251.
- Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. (1996) Hyperexpression of CD40L by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *The Journal of clinical investigation*. 97:2063-2073.

- Detre C., Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C. (2010) SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Seminars in Immunopathology*. 32 (2):157-71.
- Dong Z. y Veillette A. (2010) How do SAP family deficiencies compromise immunity? *Trends in Immunology* 31 (8):295-302.
- Dörner T., Jacobi A.M., Lipsky P.E. (2009) B cells in autoimmunity. *Arthritis Research & Therapy*. 11:247.
- Dörner T., Giesecke C. y Lipsky P. E. (2011) Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Research & Therapy*. 13:243
- Engel P., Eck M. J., Terhorst C. (2003) The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nature reviews. Immunology* 3(10): 813-21
- Fransen J.H., y col. (2010) The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*. 12(2):207
- Gleisner M.A., Reyes P. y col. (2013) Dendritic and stromal cells from the spleen of lupic mice present phenotypic and functional abnormalities. *Molecular Immunology* 2013;54:423-434.
- Gleisner M.A. (2013) Rol de las células dendríticas en el lupus. Tesis de Doctorado. Chile. Universidad de Chile.
- Griewank K., y col. (2007) Homotypic Interactions Mediated by Slamf1 and Slamf6 Receptors Control NKT Cell Lineage Development. *Immunity*. 27(5): 751-762.
- Gubbels, M. R., T. N. Jorgensen, y col. (2005) Effects of MHC and gender on lupus-like autoimmunity in Nba2 congenic mice. *Journal of Immunology* 175(9): 6190-6.
- Howie D. y col. (2002 a) Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood*. 99 (3):957-65.
- Howie D. y col. (2002 b) The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon γ production. *Blood*. 100 (8): 2899-2907.
- Hron J.D., y col. (2004) SH2D1A Regulates T -dependent Humoral Autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*. 200 (2):261-6
- Jorgensen T.N., y col. (2010) Development of murine lupus involves the combined genetic contribution of the SLAM and Fc γ receptors intervals within the Nba2 autoimmune susceptibility locus. *Journal of Immunology*. 15, 775-786

- Kamperschroer C., Roberts D.M., Zhang Y., y col. (2008) SAP enables T cells to help B cells by a mechanism distinct from Th cell programming or CD40 ligand regulation. *Journal of Immunology*. 181 (6): 3994-4003
- Kumar K. K. y col. (2006) Regulation of B Cell Tolerance by the Lupus Susceptibility Gene Ly108. *Science*. 16;312(5780):1665-9.
- Kyewski B. y Klein L. (2006) A Central Role for Central Tolerance. *Annual review of immunology*. 24:571-606
- Mehrle S, Frank S, Schmidt J, y col. (2005) SAP and SLAM expression in anti-CD3 activated lymphocytes correlates with cytotoxic activity. *Immunology and cell biology*. 83(1):33-9.
- Mikhalap S.V. y col. (2004) The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood*. 104: 4063-4070.
- Morel L., y col. (2001) The major systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(4):1787-92.
- Moulton V. R, Tsokos G.C. (2011) Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*. 13:207
- Nichols, K. E., C. S. Ma, y col. (2005). Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunological Reviews*. 203: 180-99.
- Niewold T.B. y col. (2010) Interferon Alpha in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 1-8.
- Ohl K. y Tenbrock K. (2011) Inflammatory Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 1-14
- Perry, D. y col. (2011). Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2011: 1-19.
- Punnonen J., y col. (1997) Soluble and Membrane-bound Forms of Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) Induce Proliferation and Ig Synthesis by Activated Human B Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 185:993-1004.
- Rahman, A., e Isenberg D.A. (2008) Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of Medicine*. 358 (9): 929-939
- Rethi, B., P. Gogolak, y col. (2006). SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 107(7): 2821-9.

- Rioux J.D. y Abbas A.K. (2005) Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature Insight Review*. 435: 584-589
- Romero X., y col. (2004) Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens*. 64(2): 132-144.
- Rymarchyk S.L., y col. (2008). Widespread natural variation in murine natural killer T-cell number and function. *Immunology*. 125(3): 331-343.
- Sanz I, Lee FE. (2010) B cells as therapeutic targets in SLE. *Nature Reviews Rheumatology*. 6:326-37.
- Schwartzberg P.L., y col. (2009) SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nature Reviews Immunology*. 9(1): 39-46.
- Strober W. y Gottesman S.R.S. (2009) *Immunology, Clinical case studies and disease pathophysiology*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. pp. 96-98, 283-297.
- Tangye S.G., Nichols K.E., Ma C.S. (2007) Regulation of Cellular and Humoral Immune Responses by the SLAM and SAP Families of Molecules. *Annual Review of Immunology*. 25: 337-79.
- Veillette, A., M. E. Cruz-Munoz, y col. (2006 a). SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends in Immunology* 27(5): 228-34.
- Veillette, A. (2006 b). Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nature Reviews*. 6: 56-66.
- Vilar M., Frutuoso M., Arruda S.M., Lima D.M., Bezerra C.S., Pompeu M.M. (2011) The role of the SLAM-SAP signaling pathway in the modulation of CD4+ T cell responses. *Brazilian journal of medical and biological research*. 44(4):276-82.
- Wang, N., A. Satoskar, y col. (2004). The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *Journal of Experimental Medicine* 199(9): 1255-64.
- Wakeland, E. K., K. Liu, y col. (2001). Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 15(3):397-408.
- Wentworth J., y Davies C. (2009) Systemic lupus Erythematosus. *Nature Reviews*. 8: 103-104
- Wherry, E John (2011). T cell exhaustion. *Nature Immunology* 12: 492-499.
- Yanaba K. y col. (2008) B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological reviews*. 223: 284-99