

UCH-FC  
Doc-BM CN  
G 557  
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO



# **PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL DESARROLLO DEL LUPUS**

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

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y  
Neurociencias**

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
Por

**María Alejandra Gleisner Muñoz**

Septiembre 2013

Director de tesis: Dra. María Rosa Bono Merino  
Co-Director de Tesis: Dr. Mario César Rosemblatt Silber

Santiago, Chile  
2013

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



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

**MARÍA ALEJANDRA GLEISNER MUÑOZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 13 de Agosto del 2013.

Director de Tesis:  
Dr. Maria Rosa Bono

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Maria Rosa Bono", written over a dotted line.

Co-Director de Tesis  
Dr. Mario Rosemblatt

.....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Marco Tulio Nuñez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marco Tulio Nuñez", written over a dotted line.

Dr. Flavio Salazar Onfray

.....

Dr. Arturo Ferreira Vigouroux

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arturo Ferreira Vigouroux", written over a dotted line.

Dr. Alexis M Kalergis

.....

Dr. Sergio Iacobelli Gabrielli

.....

A los que me apoyaron y creyeron en mi; familia, amigos y Pepe.



## BIOGRAFÍA



La familia Gleisner se compone de mis padres, mis 4 hermanos, sus parejas, mis sobrinos, mis mascotas y las mascotas de algún miembro de esta alocada familia. Nací en Santiago el 9 de Enero de 1981. Mi infancia fue muy agitada y siempre había algo con que jugar, algo que descubrir. Al entrar al colegio eran tantas las ganas que tenía de hacer cosas, que participé en cosas muy diversas como coro, gimnasia, etc. Al llegar a la enseñanza media me dí cuenta que me gustaba estudiar, comencé a interesarme en la ciencia y como no, en el deporte. Entré a la Universidad, y decidí hacer mi tesis de pregrado en Inmunología, el descubrimiento de un mundo fascinante, que hasta el día de hoy me seduce...

## AGRADECIMIENTOS

Con este escrito termina una linda etapa de mi vida, la cual me ha servido para aprender del esfuerzo y la perseverancia. En primer lugar quisiera agradecer a mi familia por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento incluso en aquellos días no tan buenos.

También me gustaría agradecer a mis jefes, Maria Rosa y Mario por sus conocimientos y por darme la oportunidad de trabajar en un laboratorio simplemente extraordinario. Aprecio el apoyo de ambos y lamento todos los errores involuntarios que no fueron menores. Los recordaré con cariño y admiración.

Dentro de la familia del laboratorio quiero agradecer de manera especial a Leonardo alias "Leito", por todos sus consejos, por su ayuda experimental y por su contención en los momentos frustrantes de la Ciencia. Gracias a Daniela Sauma por sus consejos y encauces, y a los que ya no están como Raúl, Gonzalo, Paula, Jaime, Pablo Vargas, Pablo Espejo, Pazturri, la Silvia, la chica, la Jafi y la Caco. También agradezco a las compañeras mas actuales de laboratorio; Gabi, Pauli, Vale, Cami, Yessia, Nati, Paula, Coté, Domi, Felipe, Juanjo y Coni. Gracias a todos por las largas horas de discusión, por la alegría de cada día, por las pastillas de carbón de los días martes y por ser un excelente equipo de trabajo, los quiero mucho. No puedo dejar afuera de esta gran familia de inmunolab a la Pame, al Oscar y también Zoila. Sin ellos el trabajo seria tremendamente más complicado.

A mis compañeros de la U en especial a la Pame, Carol, Laura, con las cuales he pasado momentos realmente buenos y porque han estado presentes en las buenas y en las no tanto.

A mis partners futboleras que siempre están dispuestas a jugar una pichanga y conversar un tercer tiempo, que finalmente servían de terapia psicológica aunque ellas no lo supieran, Dani, Jafi, Caro, Dinki, Cami, entre otras.

Finalmente quiero agradecer a PP, mi partner, amigo y pareja. El no estuvo durante todo el proceso de mi tesis, sin embargo estuvo en los momentos mas decisivos y difíciles, me ha apoyado y aguantado siempre en todo lo que se me ha ocurrido.

A todos muchas gracias y los quiero un montón.

**Agradezco el fundamental apoyo financiero de las siguientes instituciones:**

**Beca CONICYT para estudios de Doctorado**

**Becas CONICYT para termino de Tesis**

**Proyectos FONDECYT 1100448, 1100557**

**Beca PFB-16**

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Lupus eritematoso sistémico.....	1
1.2. Alteraciones inmunológicas en el LES.....	2
1.2.1 Auto-anticuerpos.....	2
1.2.2 Complemento y lupus.....	3
1.2.3 Células dendríticas y lupus.....	4
1.2.4 Linfocitos y lupus.....	7
1.2.5 Microambiente y lupus.....	9
1.2.6 Receptores SLAM y lupus.....	11
1.3 Modelo murino de lupus: ratones (NZBW)F1.....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	16
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	17
2.1 Animales.....	17
2.2 ELISA para la detección de anticuerpos anti-DNA de doble hebra.....	17
2.3 Anticuerpos y reactivos.....	18
2.4 Inmunofluorescencia.....	19
2.5 Detección intracelular de Foxp3.....	19
2.6 Aislamiento de células de médula ósea, linfonodos y bazo.....	20
2.7 Purificación de DCs de bazo.....	21

2.8 Aislamiento de diferentes sub-poblaciones celulares mediante cell sorter.....	22
2.9 SDS-PAGE y Western blot.....	23
2.10 Aislamiento de Linfocitos T reguladores.....	24
2.11 Marcaje de LT con CFSE.....	25
2.12 Ensayo de supresión.....	26
2.13 Co-cultivo de DCs con LT.....	26
2.14 Marcaje de DCs con Calceína.....	27
2.15 Marcaje de DCs con TRITC.....	27
2.16 Ensayos de homing.....	28
2.17 Preparación de estroma de bazo.....	28
2.18 Aislamiento de RNA.....	29
2.19 PCR Arrays.....	30
2.20 Análisis estadístico.....	31
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Homeostasis alterada de las células dendríticas durante el desarrollo del lupus.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Las células dendríticas presentes en el bazo de ratones lúpicos se encuentran en un estado anormal de activación.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Hiperactivación de los linfocitos B y T durante el desarrollo del lupus.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4. Células dendríticas provenientes de ratones lúpicos inducen la diferenciación de los linfocitos T a un fenotipo Th1.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5. Las DCs de ratones lúpicos migran preferencialmente al bazo comparado a DCs provenientes de ratones controles.....</b>	<b>61</b>
<b>3.6. Receptores de quimioquinas y quimioquinas presentes en las células dendríticas de bazo.....</b>	<b>64</b>
<b>3.7. El estroma de bazo de ratones lúpicos presenta quimioquinas capaces de atraer precursores de DCs.....</b>	<b>68</b>

4. DISCUSION.....	70
5. CONCLUSIÓN.....	82
6. BIBLIOGRAFÍA.....	83

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. El bazo, linfonodo mesentérico (MLN) y sangre de ratones lúpicos presenta un aumento en el porcentaje de DCs comparado a ratones pre-lúpicos y controles....35**
- Figura 2. Los ratones lúpicos presentan diferencias en los porcentajes de cDC y pDC en sangre y órganos linfoides secundarios.....36**
- Figura 3. Las células dendríticas provenientes de ratones lúpicos presentan un fenotipo hiperactivado comparado a DCs de ratones pre-lúpicos y controles.....40**
- Figura 4. cDC y pDC de ratones lúpicos muestran diferencias en la expresión de SLAM F1 y SLAM F3.....41**
- Figura 5. cDC de ratones pre-lúpicos y lúpicos sobre-expresan EAT-2 comparado con ratones controles.....42**
- Figura 6. Linfocitos B provenientes de bazo de ratones lúpicos poseen un fenotipo activado comparado con LB que provienen de ratones pre-lúpicos y controles.....48**
- Figura 7. Linfocitos B de ratones lúpicos expresan mayores niveles de SLAM F1 que LB de ratones controles y pre-lúpicos.....49**
- Figura 8. Linfocitos B de ratones lúpicos sobreexpresan SAP y EAT-2 comparados a linfocitos B de ratones pre-lúpicos y controles.....50**
- Figura 9. Linfocitos T CD4+ de bazo de ratones lúpicos presentan un fenotipo activado comparado a LT CD4+ de ratones controles o pre-lúpicos.....51**
- Figura 10. LT CD4+ de bazo de ratones lúpicos sobre-expresan SLAM F1 y F6 comparado a LT CD4+ de ratones controles y pre-lúpicos.....53**

<b>Figura 11. El bazo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de LTregs CD25-comparado a ratones control y prelúpicos.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 12. Linfocitos T reguladores CD25+ de ratones lúpicos presentan actividad supresora normal.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 13. Linfocitos T reguladores de ratones lúpicos poseen un fenotipo de LT activados.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 14. Las DCs de bazo de ratones lúpicos inducen un fenotipo Th1 en linfocitos T vírgenes.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 15. Las DCs de bazo de ratones lúpicos no inducen SLAM F1 en linfocitos T vírgenes.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 16. Las DCs de bazo de ratones lúpicos y prelúpicos migran mas eficientemente al bazo que las DCs control.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 17. Expresión génica de receptores de quimioquinas y quimioquinas presentes en las DCs de bazo de ratones controles y lúpicos.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 18. Las DCs lúpicas pierden la expresión de CCR9 y CCR4.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 19. Expresión génica de receptores de quimioquinas y quimioquinas en células estromales de bazo de ratones lúpicos, prelúpicos y controles.....</b>	<b>69</b>

## ABREVIATURAS

<b>2-ME:</b>	2 mercapto-etanol
<b>ADN:</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNdh:</b>	ADN de doble hebra
<b>ANA:</b>	Anticuerpos anti-nucleares
<b>APC:</b>	Aloficocianina ( <i>Allophycocyanin</i> )
<b>APCs:</b>	Células presentadoras de antígenos ( <i>Antigen Presenting Cells</i> )
<b>APRIL:</b>	Ligando miembro de la familia de TNF ( <i>A Proliferation Inducing Ligand</i> )
<b>AR:</b>	Artritis Reumatoide
<b>ARN:</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BAFF:</b>	Factor activador de linfocitos B ( <i>B-cell Activating Factor</i> )
<b>BM:</b>	Médula ósea (Bone Marrow)
<b>BSA:</b>	Seroalbúmina de bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CD:</b>	Antígenos de diferenciación ( <i>Cluster differentiation</i> )
<b>CCL:</b>	Ligando de quimioquina CC ( <i>CC-chemokine ligand</i> )
<b>CXCL:</b>	Ligando de quimioquina CXC ( <i>CXC-chemokine ligand</i> )
<b>cDC:</b>	Células dendríticas convencionales ( <i>conventional Dendritic Cells</i> )
<b>CFSE:</b>	Succinimidil Diacetato de Carboxifluoresceína ( <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> )
<b>CpG:</b>	Dinucleótidos de citidina fosfato guanosina
<b>CTLA-4:</b>	Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico ( <i>Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4</i> )
<b>DCs:</b>	Células dendríticas ( <i>Dendritic Cells</i> )
<b>DTT:</b>	Ditiotreitol (DiThioThreitol)
<b>EAT-2:</b>	Transcrito 2 derivado de sarcoma de Ewings ( <i>Ewing's sarcoma-Associated Transcript-2</i> )

<b>ELISA:</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>FCS:</b>	Suero Fetal Bovino ( <i>Fetal calf serum</i> )
<b>FITC:</b>	Fluoresceína-5-isotiocianato ( <i>Fluorescein iso thyocyanato</i> )
<b>Foxp3:</b>	Factor de transcripción forkhead caja P3 ( <i>Forkhead box P3</i> )
<b>IFN-<math>\alpha</math>:</b>	Interferon $\alpha$
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferon $\gamma$
<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina
<b>IH:</b>	Índice de homing ( <i>Homing Index</i> )
<b>IL:</b>	Interleuquina
<b>LB:</b>	Linfocitos B
<b>LES:</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>LT:</b>	Linfocitos T
<b>LPS:</b>	Lipopolisacárido
<b>MLN:</b>	Linfonodo mesentérico ( <i>Mesenteric Lymph node</i> )
<b>NZB:</b>	Cepa de ratón New Zealand Black
<b>NZW:</b>	Cepa de ratón New Zealand White
<b>(NZBW) F1:</b>	F1 del cruzamiento de las cepas de ratones NZW y NZB ( <i>New Zealand black x New Zealand White</i> ) F1)
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PD-1:</b>	Receptor de muerte programada 1 ( <i>Programmed Death-1</i> )
<b>pDCs:</b>	Células dendríticas plasmacitoides ( <i>plasmacytoid Dendritic Cells</i> )
<b>PI:</b>	Yoduro de propidio ( <i>Propidium Iodide</i> )
<b>PLN:</b>	Linfonodo periférico ( <i>Pheripheral Lymph Node</i> )
<b>SAP:</b>	Proteína asociada a SLAM ( <i>SLAM-Associated Protein</i> )
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )

- SLAM:** Molécula linfocitaria activadora de señales (*Signalling Lymphocyte Activation Molecule*)
- TLR:** Receptores tipo Toll (*Toll Like Receptor*)
- Tregs:** Linfocitos T reguladores
- TRITC:** Tiocianato de tiorodamina (*Tetramethylrhodamine isothiocyanate*)
- XLP:** Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (*X-linked Lymphoproliferative Syndrome*)

## RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la activación de linfocitos T y B autoreactivos, la producción de autoanticuerpos y la formación de complejos inmunes. La etiología de esta enfermedad es desconocida no obstante existen factores genéticos y medioambientales que contribuyen a su desarrollo. Por otra parte, las células dendríticas (DCs) constituyen una población heterogénea de células presentadoras de antígenos que regulan la activación y diferenciación de los linfocitos T y B. En este trabajo postulamos que las células dendríticas sufren cambios funcionales importantes relacionados con la patogénesis del lupus. La acción de las células dendríticas depende de su localización en los tejidos y del estado de activación al momento de interactuar con los linfocitos T y B. Nuestros resultados obtenidos en el modelo murino de lupus (NZBW)F1 demuestran que en el bazo de ratones que han desarrollado lupus se produce un incremento anormal en el número de DCs, en particular de la subpoblación de células dendríticas plasmacitoides (pDC) comparado a células dendríticas convencionales (cDC). Ambas subpoblaciones de células dendríticas presentan un fenotipo anormal, caracterizado por una sobre expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, PD-L1, PD-L2 y un patrón de expresión de los receptores SLAM diferente de aquel de células dendríticas de ratones controles y prelúpicos. En consecuencia, los linfocitos B y T CD4+ provenientes de bazo de ratones lúpicos presentan un fenotipo activado caracterizado por una mayor expresión de moléculas de co-estimulación (CD80/CD86) y de activación (PD-1/CD25/CD69). Por otra parte los linfocitos T y B presentaron un patrón diferencial de receptores SLAM. Experimentos de co-cultivos entre DCs, LT y LB sugieren la participación de estos receptores en el desarrollo de la enfermedad. Para investigar los mecanismos involucrados en la acumulación de células dendríticas en el bazo de los ratones lúpicos, realizamos ensayos de migración competitivos y analizamos por PCR Arrays los niveles de expresión de un conjunto de quimioquinas y de receptores de quimioquinas. Los experimentos de migración demostraron que las

células dendríticas del bazo de ratones prelúpicos y lúpicos migran preferencialmente al bazo en comparación con células dendríticas de ratones control. Estos resultados sugieren que la acumulación de células dendríticas en el bazo de ratones lúpicos está relacionada con la expresión de un patrón de expresión génico específico de quimioquinas y receptores de quimioquinas en las células dendríticas y en el estroma del bazo de ratones lúpicos que permite su acumulación en este órgano. El conjunto de estos resultados demuestran que las alteraciones funcionales encontradas en las células dendríticas durante el desarrollo del lupus favorece el estado de hiperactivación de linfocitos T y B contribuyendo así al desarrollo de la enfermedad.

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the activation of autoreactive T and B lymphocytes, the production of autoantibodies and the formation of immune complexes. Although its etiology is unknown, genetic and environmental factors contribute to its development. On the other hand, dendritic cells (DCs) constitute a heterogeneous population of antigen presenting cells regulating the activation and differentiation of T and B lymphocytes. In this work we propose that dendritic cells undergo important functional changes related with the pathogenesis of lupus. Dendritic cell action depends on their tissue localization and activation state at a moment when they interact with T and B cells. Our results, obtained on the lupus-prone mouse model (NZBW) F1, allow us to propose that the spleen of lupic mice produces an abnormal increase in the number of DCs, specifically the plasmacytoid dendritic cell (pDC) subpopulation instead of conventional dendritic cells (cDC). Both subpopulations of dendritic cells show an abnormal phenotype, characterized by the over-expression of the co-stimulatory molecules CD80, CD86, PD-L1, PD-L2 and also a different expression pattern of the SLAM receptors. Consequently, splenic B and CD4+ T lymphocytes from lupic mice show an activated phenotype characterized by a higher expression of co-stimulatory (CD80/CD86) and activation (PD-1/CD25/CD69) molecules. On the other hand, T and B lymphocytes showed a differential pattern of SLAM receptors. Co-culturing DCs, T cells and B cells suggest that these receptors participate in the disease development. To investigate the mechanisms involved in the accumulation of dendritic cells in the spleen of lupic mice, we carried out competitive migration assays and also analyzed by PCR Arrays the expression levels of a group of chemokines and chemokine receptors. The migration experiments demonstrated that splenic dendritic cells from prelupic and lupic mice preferentially migrate to the spleen in comparison to dendritic cells from control mice. These results suggest that the accumulation of dendritic cells in the spleen of lupic mice is related with the expression of a specific gene expression pattern of chemokine and chemokine receptors on splenic

dendritic cells and splenic stroma of lupic mice, which allows their accumulation in this organ. All these results allow us to propose that the functional alterations found in dendritic cells during the development of lupus favors the hyperactive state of both T and B lymphocytes, which in conjunction contribute to the development of the disease.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta múltiples órganos, entre los cuales se encuentran los riñones, las articulaciones, la piel, el corazón y los pulmones (McCowan, 1998). Se estima que a nivel mundial existen cerca de 5 millones de personas con algún tipo de Lupus. En Chile, la cifra ascendería a 30.000 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), de los cuales 27.000 serían mujeres. El 90% de los casos se presenta en mujeres, principalmente en edad fértil los cuales presentan episodios de crisis y de remisión, lo cual es independiente del tratamiento recibido (Guía clínica: lupus eritematoso sistémico, MINSAL/SOCHIRE 2011).

Desde un punto de vista inmunológico, el LES es un trastorno inflamatorio que se caracteriza por la presencia de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) autoreactivos y la producción de autoanticuerpos contra componentes nucleares, los cuales corresponden principalmente a los isotipos de inmunoglobulinas (Ig) fijadoras del complemento IgG1 e IgG3. La generación y deposición de los complejos inmunes, formados entre los auto-anticuerpos y el DNA, en el riñón activan la cascada del complemento y reclutan a neutrófilos, los cuales inducen una serie de eventos que culminan con el daño inflamatorio de la membrana basal (glomerulonefritis), la liberación de proteínas en la orina y el consecuente desarrollo de proteinuria (Carroll, 2004).

La etiología de esta enfermedad es desconocida sin embargo se conoce que existen factores genéticos que contribuyen importantemente en el riesgo a desarrollarla (Fairhurst et al, 2006; Wakeland et al, 2001). El tratamiento de pacientes con LES se basa principalmente en la inmunosupresión no específica y en el control de los síntomas, previniendo a la vez el daño de órganos, sin embargo no existe cura para esta enfermedad (Guía clínica: lupus eritematoso sistémico, MINSAL/SOCHIRE 2011).

## **1.2. Alteraciones inmunológicas en el LES**

En esta enfermedad, la principal fuente de autoantígenos son nucleosomas, ss-dsDNA o cuerpos apoptóticos (Casciola-Rosen et al, 1999; Casciola-Rosen & Rosen, 1997; Casciola-Rosen et al, 1994), los cuales son fagocitados por DCs y presentados a las células T a través de las moléculas MHC. La activación de las células T autoreactivas permite las interacciones entre linfocitos T y B, permitiendo la diferenciación de LB hacia células plasmáticas, las cuales secretan los auto-anticuerpos patogénicos (Fairhurst et al, 2006), forman complejos inmunes y se depositan en los tejidos.

### **1.2.1 Auto-anticuerpos**

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la producción de un amplio espectro de anticuerpos que se asocian con una gran variedad de manifestaciones clínicas. Estos anticuerpos son producidos por la activación de los linfocitos B auto-reactivos que reconocen auto-antígenos nucleares, de membrana celular, proteínas plasmáticas y de matriz extracelular. Esta excesiva

activación se refleja en los más de 100 auto-anticuerpos descritos hasta el momento en el LES, cada uno de ellos con distinto valor diagnóstico y pronóstico (Marks & Tullus, 2012).

Los ANAs, anticuerpos dirigidos contra auto-antígenos localizados en el núcleo celular, pueden clasificarse de acuerdo con la estructura reconocida, en anticuerpos dirigidos contra nucleosomas (anti-ADN, antihistonas, anti-DNP o complejo DNA-histona), proteínas no histonas asociadas al ADN (anticentrómero, anti-Sc170, anti Ku, antiláminas nucleares, anti-HMG, anti-PCNA y otros), proteínas no histonas asociadas al RNA (anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La, anti-Jo-1 y otros anti-ENA) y nucléolos (antinucleorales) (Marks & Tullus, 2012).

Los anticuerpos antinucleares, ANAs, están presentes en el 98% de pacientes diagnosticados con LES. Sin embargo su presencia no es específica de esta enfermedad ya que pueden estar presentes en pacientes con otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoídea y esclerodermia. La especificidad de los ANA encontrados en el LES son principalmente dsDNA, ssDNA, Sm, Ro, la, cromatina e histonas. En general, los títulos de los auto-anticuerpos no se correlacionan con la enfermedad, excepto los anticuerpos anti-dsDNA, sugiriendo un rol patogénico para ellos (Marks & Tullus, 2012; Tan, 2012).

### **1.2.2 Complemento y lupus**

El sistema del complemento está implicado en la patogénesis del LES pudiendo actuar como mediador de la inflamación o bien proporcionar protección para evitar

respuestas autoinmunes. Los complejos inmunes activan a la primera componente de la vía clásica del complemento C1, lo que lleva a la formación del complejo C3 convertasa. Alteraciones en este importante paso causa lesiones tisulares y manifestaciones del LES (Muller-Eberhard, 1988). Hallazgos posteriores han demostrado que la asociación del sistema del complemento con el LES es mucho más compleja. Se ha documentado que pacientes con LES poseen deficiencias hereditarias de ciertas proteínas del complemento (Pickering et al, 2000) y que hasta un tercio de los pacientes con esta enfermedad tienen altos niveles de autoanticuerpos que reconocen C1 (Siegert et al, 1993), proteína esencial para la activación del complemento.

### **1.2.3 Células Dendríticas y lupus**

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno (APCs) capaces de inducir inmunidad o tolerancia. Señales de "daño" como inflamación o infección inducen la maduración de las DCs que continuamente capturan antígenos desde tejidos periféricos. Este proceso incluye la redistribución hacia la superficie de las DCs de moléculas de histocompatibilidad (MHC) cargadas con antígenos, un aumento en la expresión de moléculas de coestimulación y su migración hacia las áreas T de los órganos linfoides donde presentan los antígenos procesados a los linfocitos T (LT) provocando la proliferación y diferenciación de éstos y la iniciación de la respuesta inmune. Por otro lado, la interacción de linfocitos T vírgenes con DCs inmaduras induce tolerancia periférica, por mecanismos que incluyen anergia/delección de linfocitos o la

generación de LT reguladores (Banchereau et al, 2000). Adicionalmente, se ha demostrado que las DCs modulan la función de los LB. Pueden capturar y retener al antígeno no procesado y entonces transferirlo a LB vírgenes para iniciar una respuesta humoral (Wykes et al, 1998) e inducir la diferenciación terminal de LB hacia células plasmáticas independiente de LT a través de la producción de IFN- $\alpha$  e IL-6 (Jego et al, 2003; Poeck et al, 2004) y de manera contacto dependiente (Jorgensen et al, 2010).

Se ha documentado que las DCs son una población de células muy heterogéneas (Steinman & Idoyaga, 2010). Las células dendríticas convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC) representan las dos principales subpoblaciones de DCs las cuales cumplen diferentes funciones en la respuesta inmune. Las cDC se caracterizan por expresar elevados niveles de CD11c y por su capacidad de estimular fuertemente la respuesta inmune adaptable. Por el contrario, las pDC se caracterizan por expresar menores niveles de CD11c y por expresar B220. Adicionalmente, secretan elevados niveles de la citoquina IFN- $\alpha$  cuando reconocen secuencias de DNA de virus o bacterias (Reizis et al, 2011).

Debido a su rol protagónico en inmunidad y tolerancia, las DCs han sido implicadas en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes y particularmente en el lupus eritematoso sistémico (LES). La presencia de LT y LB autoreactivos en el LES sugiere que esta enfermedad puede ser inducida por alteraciones funcionales en las células dendríticas (Palucka et al, 2002).

El interferón de tipo I (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) ha sido asociado con autoinmunidad, en particular ha sido asociado como un factor crítico en el desarrollo del LES (Hooks et al, 1979). En efecto, pacientes con LES contienen elevados niveles de IFN- $\alpha$  en el suero y estos niveles se correlacionan con la actividad y severidad de la enfermedad (Thibault & Utz, 2003). Por otra parte, se ha propuesto un papel patogénico de IFN- $\alpha$  en LES ya que i) el tratamiento de ratones con esta citoquina induce daño renal (Moss et al, 1988), ii) las terapias de pacientes con tumores tratados con IFN- $\alpha$  inducen la producción de anticuerpos anti-DNA (Ioannou & Isenberg, 2000) y iii) al tratar ratones recién nacidos con IFN- $\alpha$  se reducen las poblaciones de LT y LB en un 80%, fenómeno observado en pacientes lúpicos (Lin et al, 1998). El IFN- $\alpha$  es producido principalmente por las pDCs, las que son capaces de secretar elevados niveles de esta citoquina cuando reconocen DNA de virus o bacterias que contienen secuencias CpG. En los pacientes con LES, las pDCs están continuamente siendo activadas por complejos inmunes que contienen DNA propio y anticuerpos (Barrat et al, 2005; Gilliet et al, 2008; Ronnblom et al, 2003). La producción de IFN- $\alpha$  por pDCs en estos pacientes induce la activación y maduración de las DCs mieloides (mDCs) que estimulan a los LT autoreactivos (Blanco et al, 2001). Además, el IFN- $\alpha$  secretado por las pDCs, en conjunto con IL-6, estimulan la diferenciación de LB autoreactivos a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Jego et al, 2003). Se ha descrito que en sangre periférica de pacientes con LES, el número de pDCs se encuentra disminuido, debido posiblemente a la migración de estas células hacia los tejidos linfoides periféricos y sitios de inflamación (Cederblad et al,

1998; Gill et al, 2002). De hecho, se han encontrado pDCs maduras en las lesiones cutáneas de pacientes con LES (Farkas et al, 2001). En ratones, contrario a lo ocurrido en humanos, se ha mostrado una acumulación de DCs tanto en sangre periférica (Ishikawa et al, 2002) como en el bazo de ratones con lupus (Kalled et al, 2001).

Estudios anteriores han abordado el tema de la estabilidad del fenotipo de las DC en los pacientes con LES (Crispin et al, 2012; Decker et al, 2006; Ding et al, 2006; Koller et al, 2004) y en modelos murinos de la enfermedad (Colonna et al, 2006; Wan et al, 2007; Zhu et al, 2005). Aunque estos resultados son variables, el concepto predominante es que las DCs de los pacientes con LES están anormalmente activadas, caracterizado por una alta expresión de marcadores de maduración como CD80, CD86, CD40, un incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y una expresión alterada de receptores de quimioquinas (Gerl et al, 2010), contribuyendo así al desarrollo de la enfermedad.

#### **1.2.4 Linfocitos y lupus**

Los linfocitos B son esenciales en la patogénesis del lupus debido a la producción de auto-anticuerpos contra antígenos nucleares. La disminución de los LB en un modelo de lupus previene la nefritis y la vasculitis, indicando que son esenciales para la iniciación y desarrollo de esta enfermedad (Shlomchik et al, 1994). Adicionalmente se demostró en un modelo de lupus, que los LB poseen un papel independiente de la secreción de anticuerpos, probablemente como APCs o contribuyendo directamente en la inflamación local (Chan et al, 1999). En pacientes

con LES activo se ha documentado un incremento de los LB autoreactivos, de memoria y células plasmáticas (Fairhurst et al, 2006; Jacobi et al, 2003) con un mayor estado de activación (Grammer & Lipsky, 2003). El uso de terapias que eliminan los LB para el LES ha generado mucho entusiasmo sin embargo no se han obtenido buenos resultados en las fases clínicas de fase III (Sanz & Lee, 2010).

Estudios en pacientes y modelos murinos con LES han demostrado que los LT CD4+ son importantes para la producción de autoanticuerpos (Busser et al, 2003). En adición, se han identificado anormalidades como una exagerada respuesta de calcio (Lioussis et al, 1998), sobre-expresión de marcadores de activación (Bijl et al, 2001; Desai-Mehta et al, 1996; Hoffman, 2004) y anomalías en la muerte celular inducida por activación (Xu et al, 2004).

Los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa suprimiendo la activación de la respuesta inmune, manteniendo así la homeostasis de este sistema y favoreciendo la tolerancia hacia autoantígenos. Se caracterizan por la expresión constitutiva del factor de transcripción Foxp3, por expresar el receptor de IL-2 (CD25) e inhibir la proliferación de LT efectores específicos (Sakaguchi et al, 2006). Alteraciones numéricas y funcionales de los Tregs se relaciona de manera directa con el desarrollo de diferentes enfermedades autoinmunes (Paust & Cantor, 2005; Sakaguchi, 2000). Se han obtenido resultados controversiales con respecto al número de Treg en sangre periférica de pacientes con LES (Bonelli et al, 2010) debido probablemente a una falta de consenso de los marcadores específicos de

esta población. Adicionalmente, algunos estudios han descrito que Treg de pacientes con LES poseen una reducida capacidad supresora comparado con individuos sanos (Lyssuk et al, 2007; Valencia et al, 2007; Vargas-Rojas et al, 2008) mientras que otros estudios no observan deficiencias funcionales de los Treg en estos pacientes (Vargas-Rojas et al, 2008; Zhang et al, 2008). Estudios recientes han descrito que pacientes con lupus activo poseen un aumento de la población de Treg CD25neg comparado con pacientes con artritis reumatoidea e individuos sanos, y que este aumento se correlaciona con la actividad de la enfermedad (Bonelli et al, 2009; Horwitz, 2010), sin embargo su función no ha sido bien definida.

#### **1.2.5 Microambiente y lupus**

En el LES, el daño en los tejidos se debe principalmente al reclutamiento de leucocitos al sitio de la inflamación. Este evento ocurre debido a la presencia de quimioquinas, proteínas de bajo peso molecular con función quimiotáctica que actúan a través de sus receptores expresados en la membrana plasmática. Se dividen en dos grandes grupos: quimioquinas homeostáticas, las cuales están involucradas en el homing fisiológico de leucocitos (Moser & Loetscher, 2001; Murphy et al, 2000) y las quimioquinas inflamatorias, las cuales están involucradas en el reclutamiento de leucocitos en sitios donde el tejido se encuentra dañado (Charo & Ransohoff, 2006; Vielhauer et al, 2007). Estudios en modelos animales con lupus, han demostrado que las células de riñón producen las quimioquinas inflamatorias CCL2, CCL4, CCL5 y CXCL10 (Segeer et al, 2000; Vielhauer et al, 2007). En otro estudio, se documentó que la

expresión de quimioquinas inflamatorias en riñón de un modelo murino de lupus precede a la infiltración de células y la secreción de citoquinas durante el inicio de la nefritis (Perez de Lema et al, 2001), pudiendo utilizarse como marcadores de esta enfermedad.

Los sitios especializados donde ocurren las interacciones DC/LT y LT/LB son los órganos linfoides secundarios (OLS) (Mueller & Germain, 2009). En estos órganos, están presentes células hematopoyéticas y células estromales. Se ha comprobado que las células estromales no sólo proporcionan soporte y organización al OLS, sino que también entregan señales sitio específicas a las células entrantes determinando el tipo de respuesta desarrollada (Hammerschmidt et al, 2008; Molenaar et al, 2009). Adicionalmente, las células estromales desempeñan un importante papel en el silenciamiento de células T autorreactivas, una función atribuida previamente al timo (Cohen et al, 2010; Lee et al, 2007). En el LES, existen pocos estudios que demuestren la contribución del microambiente (células hematopoyéticas, estromales y epiteliales) a esta patología. Uno de ellos describe que las células hematopoyéticas provenientes de médula ósea de pacientes con lupus no poseen un aspecto normal y crecen más lento (Sun et al, 2007). Con estos antecedentes es posible pensar que en el lupus, el microambiente del bazo (células estromales) pudiese estar involucrado en posibles alteraciones en este órgano.

### 1.2.6 Receptores SLAM y lupus

En el lupus, se han descrito más de 10 regiones diferentes del genoma que podrían estar relacionadas con el incremento para desarrollar lupus. La región 1q23 ha sido asociada con la pérdida de tolerancia inmune y la producción de autoanticuerpos. La región sinténica en ratones equivale al locus Sle1 o Nba2 del cromosoma 1 de las cepas New Zealand White y New Zealand Black respectivamente. Esta región génica posee varios genes candidatos que contribuyen al fenotipo del LES, como los genes de los receptores Fc, los receptores del complemento CR1/CR2 y el cluster de genes de los receptores SLAM así como también las moléculas adaptadoras responsables de la transducción de señales de las moléculas SLAM llamadas EAT2a/b (Wandstrat et al, 2004). La familia de receptores SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) y sus adaptadores intracelulares SAP (SLAM-associated protein) juegan un importante papel en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptable. La familia de genes SLAM codifican para nueve miembros; SLAM F1 (CD150), SLAM F2 (CD48), SLAM F3 (CD229 ó Ly9), SLAM F4 (CD244 ó 2B4), SLAM F5 (CD84), SLAM F6 (NTB-A ó Ly108), SLAM F7 (CD319 ó CRACC), SLAM F8 (BLAME) y SLAM F9 (SF2001). Estos se expresan en varios tipos celulares del sistema inmune incluyendo LT activados, LB, macrófagos y DCs, encontrándose que cada tipo celular puede expresar incluso más de un receptor SLAM. Casi todos los receptores SLAM establecen interacciones homotípicas a través del dominio extracelular, actuando como ligandos propios. Interesantemente, existe una gran variación en las afinidades de estas asociaciones ( $K_d \sim 0,5-200 \mu\text{M}$ ) lo que podría

contribuir a la regulación de las funciones del sistema inmune (Calpe et al, 2008; Chan et al, 2006; Veillette et al, 2006). Los receptores SLAM están compuestos de dos o cuatro (Ly9) 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 et al, 2008). Los ITSMs contienen la secuencia aminoacídica consenso TxYxxV/I la cual es reconocida por las moléculas adaptadoras de la familia SLAM, llamadas SAP, EAT-2 y ERT. Estas proteínas están compuestas esencialmente por un dominio de homología Src (SH2) fusionado a un tallo corto C-terminal. La proteína SAP se expresa en LT, NK, linfocito T natural killer (NKT) y algunos LB. En contraste, EAT-2 se expresa en NK, DCs y macrófagos, mientras que ERT solo se expresa en células NK (Calpe et al, 2008). La cascada de señalización río abajo de SLAM ha sido extensamente estudiada en el contexto de la activación de los LT. Estas proteínas establecen un nexo entre los receptores SLAM y las quinasas tipo Fyn, que regulan la activación de NFk-B dependiente de la proteína quinasa C. La importancia de esta cascada de señalización fue entendida cuando se encontró que la causa de la enfermedad humana linfoproliferativa ligada a X (XLP) se debía a una mutación en la proteína SAP (Cannons et al, 2004; Nichols et al, 2005). Esta inmunodeficiencia fatal se caracteriza por una mononucleosis fulminante, disgamaglobulemia y desordenes linfoproliferativos (Nichols et al, 2005). Algunos de los aspectos de esta enfermedad son reproducidos en el ratón SAP<sup>-/-</sup>; exagerada linfoproliferación de LT CD4 y CD8 en respuesta a virus, defectos en la memoria

asociada a los LB, en el número de células plasmáticas y centros germinales y en la producción de grandes cantidades de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación *in vitro* de LT, entre otras cosas. Por otro lado, las funciones de los receptores SLAM fueron determinadas gracias a la creación de ratones que pierden miembros individuales de la familia SLAM. Estos receptores participan en la polarización de LT hacia T<sub>H</sub>2 (Calpe et al, 2008), cambio de isotipo de LB y mantención de células plasmáticas, citotoxicidad de las células NK, desarrollo de las células NKT (Calpe et al, 2008), inhibición de las células NK dependiente de MHC (Veillette, 2006) y en la función efectora de macrófagos (Wang et al, 2004) y DCs (Rethi et al, 2006).

Estudios recientes indican que miembros de los receptores SLAM estarían implicados en la génesis y mantención de varios desórdenes autoinmunes. Se ha observado que monocitos y macrófagos provenientes del colon de pacientes con la enfermedad de Crohn poseen un aumento en la expresión de SLAM F1 (Theil et al, 2005). En un modelo de colitis, la expresión de SLAMF2 (CD48) por APCs y LT contribuye al desarrollo de la enfermedad (Abadia-Molina et al, 2006). En pacientes con artritis reumatoidea se observó un aumento en la expresión de SLAM en LT desde fluidos sinoviales (Isomaki et al, 1997). Mientras que pacientes con esclerosis múltiple muestran un aumento en la expresión de SLAM F1 en sangre periférica comparado con individuos sanos (Ferrante et al, 1998). En el lupus se ha demostrado la presencia de variantes polimórficas de los genes SLAM. Estos polimorfismos resultan en diferencias en la expresión de miembros SLAM en linfocitos, sugiriendo un rol de los receptores

SLAM en la pérdida de tolerancia de los LB (Wandstrat et al, 2004). Un estudio reciente ha descrito que las células mononucleares de sangre de pacientes con LES poseen una expresión alterada de SLAM F7 y F4 (Kim et al, 2010) mientras que otro estudio, documentó en un modelo animal de esta enfermedad, la existencia de una nueva isoforma de SLAM F6 que reduce la enfermedad (Keszei et al, 2011).

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que existen diferencias en la expresión de receptores SLAM en las pDCs de ratones que poseen el segmento génico SLAM. Concretamente se observó una disminución de la expresión de SLAM F2 (CD48), SLAM F4 (CD84) y SLAM F6 (Ly108) en pDCs en comparación con las pDCs controles (Jorgensen et al, 2010). Estos resultados sugieren que una alterada expresión de los receptores SLAM podría mediar una activación inapropiada de linfocitos y contribuir al fenotipo autoinmune del locus Nba2.

### **1.3 Modelo murino de lupus: ratones (NZBW)F1**

El modelo murino (NZBW) F1 es una cruce de las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW). Esta cepa desarrolla espontáneamente una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos antinucleares (ANA) y por el desarrollo de una glomerulonefritis (GN) fatal mediada por complejos inmunes. Los anticuerpos antinucleares poseen múltiples especificidades contra diferentes antígenos entre los cuales se encuentran el ADN de simple hebra (ssDNA), el ADN de doble hebra (dsDNA) y complejos de proteínas con ácidos nucleicos (Gioud et al, 1983). Se ha demostrado que la producción de ANA y la GN son atribuidos al intervalo Sle1 derivado

de la cepa NZW y al intervalo Nba2 de la cepa NZB (Morel et al, 1996; Rozzo et al, 1996; Wakeland et al, 2001). Los alelos de susceptibilidad Sle1 y Nba2 se superponen en la región telomérica del cromosoma 1 y se sugiere que los genes de susceptibilidad asociados a estas regiones se encuentran compartidos en ambas cepas de ratón. En este modelo, las hembras son notablemente más susceptibles a desarrollar la enfermedad que los machos (Gubbels et al, 2005). Estas características se asemejan a las encontradas en el lupus humano, por lo que estos ratones ofrecen un excelente modelo para el estudio de varias de las anomalías inmunológicas características del lupus.

## **HIPÓTESIS**

Las células dendríticas provenientes de ratones lúpicos BWF1 se acumulan en el bazo debido a cambios en las propiedades migratorias y quimioattractantes, produciendo la activación de linfocitos T y B autoreactivos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de las células dendríticas en el desarrollo del lupus eritematoso sistémico.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar las sub-poblaciones de células dendríticas presentes en diferentes órganos linfoides secundarios y analizar su estado de activación durante el desarrollo del lupus.
2. Evaluar la influencia de las células dendríticas de bazo de ratones lúpicos y normales sobre la activación de linfocitos T y B.
3. Determinar el mecanismo por el cual las DCs se acumulan en el bazo durante el desarrollo del lupus.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Animales

Ratones hembras (NZBW)F1 y NZW se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Para los experimentos se utilizaron ratones (NZBW)F1 de 3 meses que denominamos prelúpicos ya que no poseen ningún síntoma de la enfermedad, ratones (NZBW)F1 de 10 meses que denominamos lúpicos, los cuales producen anticuerpos anti-DNAh y presentan daño renal ya que tienen altos niveles de proteínas en la orina (proteinuria de 500mg/dL). Como ratones controles se utilizaron hembras de la cruce de las cepas de ratones NZWx Balbc, los cuales presentan el mismo haplotipo H-2 que los ratones (NZBW)F1, se utilizaron como cepa control. Todos los ratones se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad, con aire filtrado y comida autoclavada, en el bioterio de la Fundación Ciencia para la vida (Santiago, Chile). Los animales se sacrificaron mediante la exposición a dióxido de carbono.

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

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene Nunc International, USA) recubiertas con 3,1µg de DNA de timo de cabra (SIGMA, USA) disuelto en buffer SSC (NaCl 0,15M, citrato de sodio 0,015M pH=8). Se incubaron por 18 horas a 37°C y se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05%. Luego, las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS-BSA 1,5% y se lavaron tres veces con una

solución de PBS-Tween 0,05%. Posteriormente se agregaron los sueros de los ratones 1/500 en PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP (DAKO, USA) diluido 1/2000 en PBS-Tween 0,05%. Por último, las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100µl por pozo del sustrato proveniente del kit TMB Substrate Reagent Set (BD Bioscience, USA). La reacción se detuvo usando 50µl de una solución 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merk, USA) y se leyeron las densidades ópticas en un espectrofotómetro (JENWAY, UK).

### **2.3 Anticuerpos y reactivos**

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales adquiridos en BD Biosciences. CD3 FITC clon 17A2, CD4 FITC clon RM4-5, CD11c FITC clon HL3, CD8a FITC clon 53-6.7, CD79b FITC clon HM79b, CD80 FITC clon 16-10A1, CD4 PE clon RM4-5, CD11c PE clon HL-3, CD62L PE clon MEL-14, CD69 PE clon H1.2F3, CD11c APC clon HL3, CD273 (PD-L2) APC clon TY25, CD19 APC-H7clon 1D3. Anticuerpos adquiridos en eBiosciences: CD25 FITC clon PC61.5, CD48 (BCM1) FITC clon HM48-1, CD279 (PD-1) FITC clon J43, IFN-γ FITC clon XMG1.2, Ly108 PE clon 13G3-19D, CD86 PE clon GL-1, CD199 (CCR9) PE clon CW-1.2, CD274 (PD-L1) PE clon MIH5, CD25 APC clon PC61.5, CD45R (B220) PECY7 clon RA3-6B2, Foxp3 PECy7 clon FJK-16s. Anticuerpos adquiridos en Biolegend: CD194 (CCR4) PE clon 2G12, CD196 (CCR6) PE clon 29-2L17, CD229 (Ly-9) PE clon Ly9ab3, CD150 APC clon TC15-12F12.2, IL10 APC clon JES-516E3. Para

determinar viabilidad se utilizó LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain kit (Invitrogen, USA) y PI (Sigma Aldrich, USA). Para la activación de linfocitos T se utilizó el anticuerpo purificado CD3 clon 145-2C11 (eBiosciences). Para la técnica de Wester 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).

#### **2.4 Inmunofluorescencia**

Las células de los distintos órganos (bazo, PLN, MLN, timo, BM y sangre) se incubaron por 15 minutos con anti-CD16/CD32 dilución 1/100 (clon 2.4G2, BD Biosciences) para bloquear FcR, posteriormente las células se lavaron con PBS-FCS 2% y se centrifugaron a 400 x g por 7 min. Posteriormente, las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en PBS-FCS 2% durante 20 minutos a 4°C. Enseguida las células se lavaron con PBS-FCS 2%, se centrifugaron a 400 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en aproximadamente 300 µl de PBS-FCS 2% para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience, USA). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

#### **2.5 Detección intracelular de Foxp3**

Para el marcaje intracelular, luego del marcaje de superficie, las células se

resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en 300  $\mu$ l de la solución de fijación/permeabilización (eBioscience) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente las células se lavaron 2 veces con 700  $\mu$ l de buffer de permeabilización y se centrifugaron a 3.000 rpm por 7 minutos a 4°C. Se agregó a cada tubo 50  $\mu$ l del anticuerpo correspondiente; anti-Foxp3 (eBioscience), y el control de isotipo (rat IgG2a k, eBioscience) diluidos en buffer de permeabilización. Se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4°C, se lavaron las células 2 veces con 700  $\mu$ l del buffer de permeabilización se centrifugaron a 3.000 rpm por 7 minutos y se resuspendieron en PBS-FCS 2% para posteriormente ser analizadas mediante citometría de flujo.

## **2.6 Aislamiento de células de médula ósea, linfonodos y bazo**

**Médula ósea:** Se disecaron tibias y fémures de ratones control, prelúpicos y lúpicos y los huesos se perfundieron con 20 ml de medio RPMI (Invitrogen). La médula ósea se disgregó mediante agitación fuerte para obtener una suspensión homogénea y las células obtenidas se pasaron a través de una gaza para eliminar los agregados celulares. Las distintas poblaciones celulares se identificaron mediante la utilización de anticuerpos específicos y análisis multiparamétrico por citometría de flujo.

**Linfonodos:** Las células se obtuvieron a partir de linfonodos periféricos (PLN), bazo y linfonodos mesentéricos (MLN) desde ratones control, prelúpicos y lúpicos. Los órganos se disgregaron mecánicamente y se trataron con 1 mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20  $\mu$ g/ml de DNAsa (Sigma, USA) por 45 minutos a 37°C con agitación suave. Posteriormente, los tejidos se pasaron a través de una malla metálica de 90  $\mu$ m

para eliminar los agregados celulares y las distintas poblaciones celulares se determinaron mediante la utilización de anticuerpos específicos y análisis mediante citometría de flujo. Las células obtenidas de cada órgano se contaron para obtener el número total de células promedio recolectadas en cada uno de los ratones.

## **2.7 Purificación de DCs de bazo**

El bazo de los diferentes ratones se disgregó mecánicamente y se resuspendió en 4,5 ml de RPMI-FCS 10%. Las células se digirieron en presencia de 1mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20 µg/ml de DNAsa (Sigma, USA), y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente, las células se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm y las células se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos. Para lisar los glóbulos rojos, las células se resuspendieron en 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M, KHCO<sub>3</sub> 10mM y Na<sub>2</sub>EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FCS 5%), se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 300 µl de buffer de purificación por cada 1x10<sup>8</sup> de células y se incubaron con 30 µl de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) durante 20 minutos a 4°C con agitación. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer de purificación, se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 1 ml de buffer de purificación. Las células se seleccionaron positivamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec).

## 2.8 Aislamiento de diferentes sub-poblaciones celulares mediante cell sorter

Se realizó la digestión de los bazos de acuerdo al protocolo previamente descrito para la purificación de DCs de bazo. Las células totales del bazo se marcaron durante 20 minutos a 4°C en PBS+2% FCS con diferentes combinaciones de anticuerpos dependiendo de la población a seleccionar. Para los experimentos de Western blot se aislaron LT CD4+, LB, DCs convencionales (cDC) y DCs plasmacitoides (pDC). Las diferentes sub-poblaciones se aislaron según el siguiente fenotipo: LT CD4+ (CD79b<sup>-</sup> CD11c-B220-CD4+), LB (CD79b+CD11c-B220+CD4-), cDCs (CD79b-CD11c+B220-) y pDCs (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  $\alpha$ CD79b FITC (clon HM79b) durante 15 min a 4°C en agitación. Las células fueron lavadas y posteriormente incubadas durante 15 min a 4°C, en oscuridad y agitación con el anticuerpo secundario  $\alpha$  Armenian Hamster IgG2/3 FITC. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de  $20 \times 10^6$  cel/mL con medio PBS+2mM EDTA+0,1%BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads Goat anti-Mouse IgG durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación las células fueron pasadas por magneto y la fracción negativa fue recuperada. Posteriormente la fracción negativa fue depletada de LT. Para esto se incubó las células con el anticuerpo  $\alpha$ 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  $20 \times 10^6$  cel/mL con medio PBS+2mM EDTA+0,1%BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads Sheep anti-Rat IgG durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación las células fueron pasadas por magneto y la fracción negativa fue recuperada, la cual fue posteriormente marcada con los anticuerpos CD79b FITC, CD11c PE y B220 PeCy7, para lograr separar mediante cell sorter las células cDC y pDC. Las poblaciones celulares se separaron utilizando un cell sorter FACSAria II (BD Biosciencias) perteneciente a la Fundación Ciencia & Vida.

## **2.9 SDS-PAGE y Western blot**

Linfocitos T, linfocitos B y DCs purificadas mediante cell sorting fueron lisados con tampón de lisis (SDS 7,5%; PMSF 7,5 mM;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  7,5 mM; Tris-Cl 75 mM pH 7,4; cocktail inhibidor de proteasas) y se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas totales y luego se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización. Los extractos de proteínas fueron cuantificados mediante un ensayo BCA (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína total en tampón de carga previamente incubados 5 min a 100°C. La electroforesis se realizó a 50 V hasta que las muestras llegaran al gel concentrador y luego a 100 V. Transcurrido el tiempo de electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueo durante 16hrs 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-Igs 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 negativo para ambas proteínas adaptadoras se utilizó un lisado de suero proveniente de un ratón BALB/c. 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-Igs de conejo conjugado a HRP-Pxd diluido 1:5.000 en PBS-Tween 20 0,1%. 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 del control de carga, actina.

## **2.10 Aislamiento de Linfocitos T reguladores**

Los Tregs se aislaron desde bazo de los diferentes ratones utilizando el kit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit (N° 130-091-041, Miltenyi Biotec). Cien millones de esplenocitos se resuspendieron en 400 µl de buffer de purificación (BSA 0,5%-2 mM

EDTA en PBS) y se incubaron 10 minutos a 4°C con agitación con 100 µl de una mezcla de anticuerpos biotinilados anti- CD8α (Ly-2; isotipo: IgG2a de rata), CD11b (Mac-1; isotipo: IgG2b de rata), CD45R (B220; isotipo: IgG2a de rata), CD49b (DX5; isotipo: IgM de rata) y Ter 119 (isotipo: IgG2b de rata). Posteriormente, se agregaron 300 µl de buffer de purificación, 200 µl de MACS anti-biotina y 100 µl de anticuerpo anti CD25 conjugado a PE y se incubó en agitación por 15 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron con 10 ml de buffer de purificación y se centrifugaron a 300 x g por 10 minutos. Las células se resuspendieron en 500 µl de buffer de purificación y se seleccionaron usando columnas LD de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech). La fracción eluida corresponde a LT CD4+. Enseguida las células se incubaron con 10 µl de MACS anti-PE con agitación por 15 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron con 10 ml de buffer de purificación y se centrifugaron a 300 x g por 10 minutos. Las células se resuspendieron en 500 µl de buffer de purificación y se seleccionaron positivamente usando columnas MS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). El eluido de la columna corresponde a células T vírgenes CD4+CD25- (con una pureza mayor al 90%) y las células retenidas en la columna corresponden a LT reguladores CD4+CD25+ (pureza mayor al 95%).

### **2.11 Marcaje de LT con CFSE**

Los LT CD4+CD25- se resuspendieron a una concentración de  $10^7$  células/ml en PBS mantenido a temperatura ambiente. A la suspensión celular se le agregó 1 µl de CFSE 5mM por cada  $10^7$  células/ml y se incubó con agitación por 10 minutos en oscuridad.

Posteriormente se agregó suavemente un volumen igual de FCS y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 10 ml de medio RPMI con FCS 10% y se centrifugó a 450 x g por 7 minutos a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron a una concentración de  $2 \times 10^6$  por ml en medio IMDM suplementado (FCS 10%, 55  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol).

### **2.12 Ensayo de supresión**

Células dendríticas CD11c+ y LT virgen CD4+CD25- purificados desde el bazo de acuerdo a los protocolos descritos anteriormente y marcados con CFSE, se co-cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Orange) en una razón 2:1 ( $0,1 \times 10^6$  DC:  $0,05 \times 10^6$  LT) en 200  $\mu$ L en medio IMDM suplementado, en presencia de 1  $\mu$ g/mL de anti-CD3 (17A2, eBioscience). Estos co-cultivos se incubaron en presencia o ausencia de Tregs CD4+CD25+ obtenidos de ratones control, prelúpicos o lúpicos en una razón 1:1 con respecto a los LT CD4+CD25-. Al tercer día de co-cultivo se evaluó mediante citometría de flujo los ciclos de proliferación mediante la detección del CFSE en los LT CD4+CD25-.

### **2.13 Co-cultivos de células dendríticas y linfocitos T**

Las DCs ( $1 \times 10^6$  células/mL) y los LT ( $1 \times 10^6$  células/mL) se co-cultivaron a una razón de 1:2 en medio IMDM+10%FCS suplementado con 50  $\mu$ M de 2-ME, 50  $\mu$ g/mL de gentamicina y 0,5mg/mL de anfotericina-B (Fungizona) a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> en presencia de 1  $\mu$ g/mL de anti-CD3 (17A2, eBioscience). En donde se indique, se agregaron LB ( $5 \times 10^6$

células/mL) a una razón 5:1 con DCs. Luego de 5 días de cultivo, las células se recuperaron para el análisis por FACS.

#### **2.14 Marcaje de DCs con Calceína**

Células dendríticas purificadas del bazo de ratones control se resuspendieron a una concentración de  $10^7$  células/ml en medio DMEM suplementado con FCS 2%, 20 mM Hepes. Las células se incubaron con 2  $\mu$ l Calceína 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l por cada  $10^7$  células/ml con agitación a 37°C por 20 minutos y en oscuridad. Posteriormente, a la suspensión celular se agregó gota a gota un volumen igual de FCS. Las células se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 20°C utilizando una razón de aceleración y desaceleración igual a 4 con el fin de formar la gradiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio DMEM suplementado que se encontraba a temperatura ambiente. Las células se dejaron reposar por 5 minutos antes de ser utilizadas.

#### **2.15 Marcaje de DCs con TRITC**

Células dendríticas purificadas del bazo de ratones prelúpicos y lúpicos se resuspendieron a una concentración de  $15 \times 10^6$  células/ml en medio DMEM suplementado con FCS 2%, 20 mM Hepes. Las células se incubaron con 20  $\mu$ l TRITC 90  $\mu$ g/ml por cada  $15 \times 10^6$  células/ml en agitación a 37°C por 20 minutos y en oscuridad. Posteriormente, la suspensión celular se agregó gota a gota sobre un volumen igual de FCS. Las células se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 20°C utilizando una razón

de aceleración y desaceleración igual a 4 con el fin de formar la gradiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µl de medio DMEM suplementado que se encontraba a temperatura ambiente. Las células se dejaron reposar por 5 minutos antes de ser utilizadas.

### **2.16 Ensayos de homing**

Para esto se mezclaron  $1 \times 10^6$  DCs provenientes del bazo de ratones control marcadas con calceína con  $1 \times 10^6$  de DCs provenientes del bazo de ratones prelápicos o lúpicos marcadas con TRITC. Las células se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 200 µL de medio DMEM suplementado con FCS 2%, 20 mM Hepes. La suspensión celular se inyectó vía intravenosa en ratones control, prelápicos o lúpicos. Después de 48 h los ratones se sacrificaron, se extrajo el bazo, se disgregó mecánicamente y las células se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm. Los glóbulos rojos se lisaron y las células se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos. Los esplenocitos se resuspendieron en PBS-FCS 2% a una concentración de  $2,5 \times 10^7$  células/ml. El índice de homing (IH) se determinó mediante citometría de flujo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{I.H.} = \frac{(\text{DC TRITC}^+)_{\text{bazo}} / (\text{DC Calceína}^+)_{\text{bazo}}}{(\text{DC TRITC}^+)_{\text{entrada}} / (\text{DC Calceína}^+)_{\text{entrada}}}$$

### **2.17 Preparación de estroma de bazo**

Células del bazo de ratones control, prelápicos o lúpicos se obtuvieron disgregando mecánicamente el órgano. Posteriormente, las células se pasaron a través de una malla

metálica de 90  $\mu\text{m}$  y se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos. Las células se resuspendieron en 2 ml de solución de lisis de glóbulos rojos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida, las células se lavaron con medio  $\alpha$ -MEM (GIBCO) suplementado con 10% de FCS y se centrifugaron a 450 x g por 7 minutos. Las células se sembraron a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml en placas de 24 pozos en medio  $\alpha$ -MEM suplementado. Cada dos días se reemplazó la mitad del volumen del pozo (500  $\mu\text{l}$ ) por medio fresco. Las células se crecieron a confluencia (entre 3 a 4 semanas de cultivo) para luego proceder a aislar ARN directamente de las células adheridas a los pozos.

### **2.18 Aislamiento de RNA**

El RNA total de los cultivos primarios de células estromales se aisló usando TRIsure (Bioline). Las células se lisaron con 1ml de TRIsure por cada  $3 \times 10^6$  células pipeteándolas varias veces hasta formar una suspensión homogénea. Las muestras se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200 $\mu\text{L}$  de cloroformo por cada 1ml de TRIsure utilizado y se agitaron vigorosamente por 15 segundos, luego se mantuvieron por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa (que contiene el ARN) a otro tubo y se precipitó el ARN agregando 500 $\mu\text{L}$  de isopropanol por cada 1ml de TRIsure utilizado. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó una vez con 1ml de etanol al 75% y finalmente se centrifugó a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C.

Una vez eliminado el sobrenadante se secó el precipitado de RNA al aire y se disolvió en agua libre de DNasa y RNasa. Por último, el RNA se incubó por 10 minutos a 65°C para eliminar las estructuras secundarias. El ARN se mantuvo a -80°C hasta su uso.

### **2.19 PCR Array**

Para evaluar el nivel de expresión de genes de quimioquinas y receptores de quimioquinas se utilizó el sistema PCRArray (PAMM-012, SABiosciences, USA). Este ensayo se realizó directamente en los pozos de una placa de 96 pocillos (proporcionadas por el fabricante) que contiene 88 diferentes pares de partidores para 88 genes diferentes que incluyen quimioquinas, receptores de quimioquinas y diferentes genes de expresión constitutiva. Además, en la placa se incluyen los correspondientes controles para evaluar la posible contaminación con ADN genómico, controles para evaluar la eficiencia de la transcripción reversa y finalmente controles positivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó 1µg de RNA por muestra el cual fue tratado con 2 µl de la solución 5X gDNA Elimination Buffer (SABiosciences) durante 5 minutos a 42°C para eliminar el DNA genómico. Las muestras se enfrían rápidamente en hielo y luego se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 segundos. La transcripción reversa se realizó agregando a la mezcla tratada previamente 10 µl de RT Cocktail (SaBioscience) el que contiene 4 µl de Buffer RT 5X, 1 µl de mezcla de partidores, 2 µl de transcriptasa reversa y 3 µl de H2O libre de nucleasas. La reacción se realizó durante 15 minutos a 42°C y se detuvo incubando la mezcla a 95°C por 5 minutos. Finalmente las muestras se diluyeron con 91 µl de H2O

libre de nucleasas. La mezcla de reacción de PCR se realizó añadiendo a la solución de cDNA, 1.350  $\mu$ l de qPCR Master mix y 1.248  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Se agregaron 25  $\mu$ l de la mezcla de reacción de PCR a cada pocillo y se realizó la PCR en tiempo real de acuerdo al siguiente programa de amplificación; 1 ciclo a 95°C por 10 minutos y 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 1 minuto de extensión a 60°C en un termociclador Stratagene Mx3000p (Stratagene). Los datos adquiridos fueron exportados a una tabla Excel (Microsoft) y enviados para su análisis a la página web de SABioscience donde el software propietario analizó los  $\Delta$ Ct y  $-\Delta\Delta$ Ct de cada muestra entregando como resultado final el valor del número de veces de cambio aumento o disminución en la expresión génica en los ratones prelúpicos y lúpicos con respecto a los ratones control.

## **2.20 Análisis estadístico**

La comparación de los datos obtenidos de los diferentes ratones se realizó utilizando el ensayo t de student no paramétrico con dos colas y con intervalos de confianza de 95%. El índice de homing se analizó utilizando el test de Wilcoxon. La significancia de las veces de cambio en la expresión de los genes de las quimioquinas y genes de receptores de quimioquinas se analizó mediante t-student. Los valores de probabilidad menores a 0,05 se consideraron significativos. Todos los test estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.

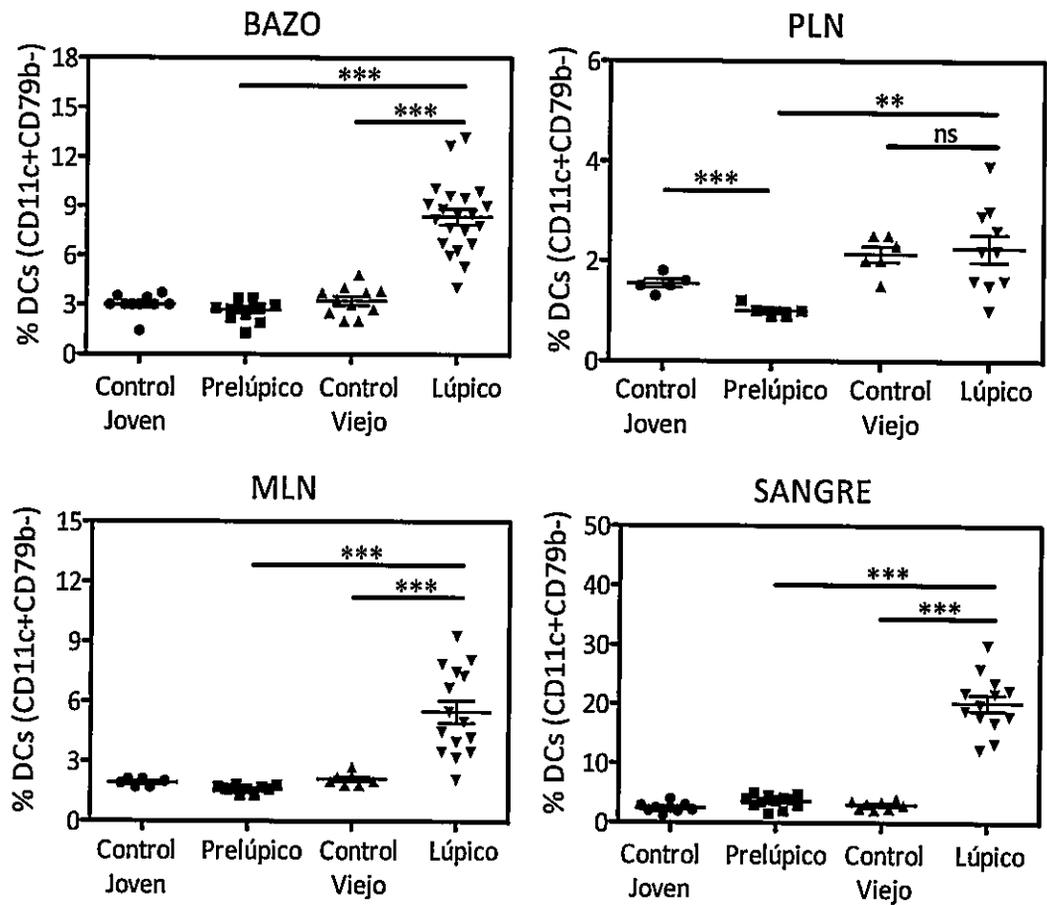
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Homeostasis alterada de las células dendríticas durante del desarrollo del lupus.

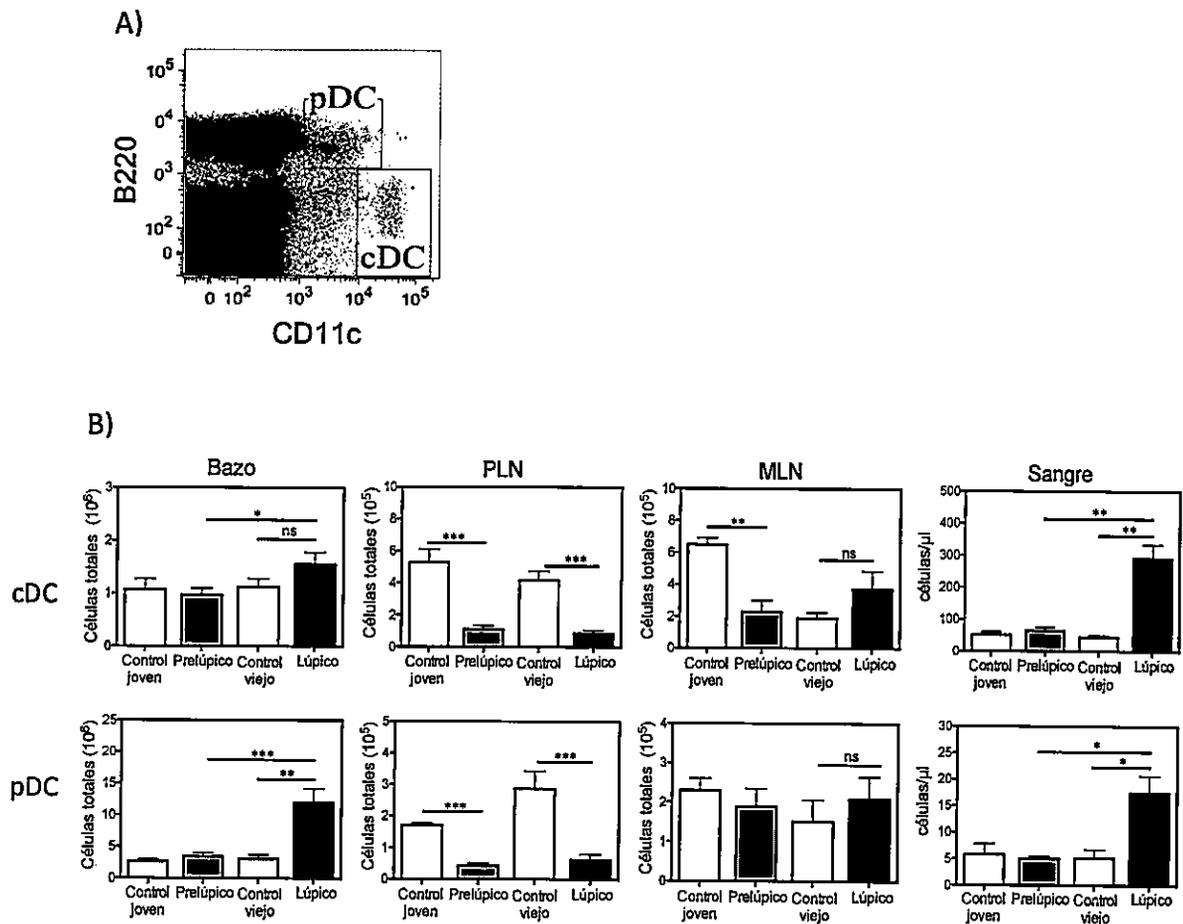
Las células dendríticas (DCs) son centrales para la iniciación de una respuesta inmune adaptativa. Resultados recientes de nuestro laboratorio demostraron que en el bazo de ratones lúpicos (NZBW)F1 se encuentran incrementadas en forma anormal las células dendríticas y que su fenotipo corresponde a células dendríticas del tipo plasmacitoides (pDCs) (Jorgensen et al, 2010). Las DCs tienen la capacidad de migrar a cualquier órgano linfoide dependiendo del estímulo que induce su movilización. Puesto que en el desarrollo del lupus se desconoce cual es el estímulo que inicia la enfermedad, nos pareció interesante determinar si la acumulación de DCs ocurría en otros órganos linfoides y determinar el fenotipo de las DCs presentes antes y después del desarrollo de la enfermedad. Nuestra estrategia a lo largo de todo este trabajo fue analizar diferentes parámetros relacionados con el desarrollo de lupus en ratones de la cepa (NZBW)F1 y correlacionarlos con la presencia y estado funcional de células inmunes como las DCs, linfocitos B y T. Analizamos la presencia de DCs en bazo, ganglio mesentérico (MLN), linfonodo periférico (PLN) y sangre en ratones prelúpicos, lúpicos y controles, según se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 1 se muestran los porcentajes de DCs totales, que definimos como células CD11c+CD79b-. CD79b es un marcador del complejo Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  que acompaña al receptor para el antígeno de los linfocitos B (BCR) y lo utilizamos para discriminar a las DCs de los linfocitos B, que sí expresan esta proteína. En la Fig. 1 se observa que los ratones lúpicos presentan un

mayor porcentaje de DCs en bazo, sangre y MLN en comparación con ratones preláupicos y controles, mientras que en PLN sólo observamos un incremento en el porcentaje de DCs cuando comparamos ratones láupicos con preláupicos. Puesto que las DCs son heterogéneas, evaluamos la presencia de las DCs convencionales (cDC) caracterizadas como CD11c+B220- y las DCs plasmacitoides (pDC) caracterizadas como CD11c<sup>int</sup>B220+ tal como se muestra a modo de ejemplo en la Fig. 2A. En la Fig. 2B se muestran los números absolutos de cDC y pDC en los diferentes órganos linfoides, los cuales se calcularon a partir de los porcentajes de cada una de las subpoblaciones de DCs y el número total de células para cada órgano. No se observaron diferencias significativas en el número de células del bazo de los distintos ratones analizados sin embargo, observamos una disminución de la celularidad en PLN y MLN de ratones láupicos comparado con ratones preláupicos y controles (datos no mostrados) . La Fig. 2B muestra en primer lugar que durante el desarrollo de la enfermedad se produce un incremento significativo del número de pDC en el bazo de ratones láupicos comparado a ratones preláupicos o controles, mientras que no se observaron diferencias en los números absolutos de cDC en los diferentes grupos de ratones. Segundo, en PLN, tanto pDC como cDC disminuyen en ratones preláupicos y láupicos comparados a ratones controles pareados por sexo y edad. Tercero, en MLN encontramos que los ratones controles tienen un mayor número absoluto de cDC comparado a todos los otros grupos de ratones, no encontrándose además diferencias en ningún grupo para las pDC. Por último, encontramos un incremento de cDC y pDC en sangre de ratones

lúpicos comparados con ratones prelúpicos y controles. El conjunto de estos resultados sugiere la existencia de un desequilibrio en la homeostasis o en la migración de las DCs, tanto pDC como cDC, durante el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 1.** El bazo, linfonodo mesentérico (MLN) y sangre de ratones lúpicos presenta un aumento en el porcentaje de DCs comparado a ratones prelúpicos y controles. Las DCs de bazo, PLN, MLN y sangre de cada grupo de ratones se obtuvieron como está descrito en Materiales y Métodos y se analizaron por citometría de flujo. Los porcentajes de DCs se determinaron a partir de células CD11c+CD79b- y en los gráficos cada punto representa la evaluación de un animal. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,0001$ ).



**Figura 2. Los ratones lúpicos presentan diferencias en los porcentajes de cDC y pDC en sangre y órganos linfoides secundarios.** A) Gráfico de punto representativo que muestra como se hizo la distinción entre los diferentes tipos de DCs basado en la expresión de CD11c y B220. Las cDC corresponden a las células CD11c+B220- y las pDC corresponden a la ventana CD11c+highB220-. Los números absolutos de DCs se calcularon en base a los porcentajes presentes en cada una de estas ventanas y el número total de células por órgano. B) Gráficos de barras que muestran los números absolutos de cDC y pDC obtenidos en bazo, PLN, MLN y sangre de ratones controles, prelúpicos y lúpicos determinado como se muestra en A (n=7). El análisis estadístico se realizó mediante un test de t de Student. \*P<0,05. \*\*P<0,001. \*\*\*P<0,0001.

### **3.2 Las células dendríticas presentes en el bazo de ratones lúpicos se encuentran en un estado anormal de activación.**

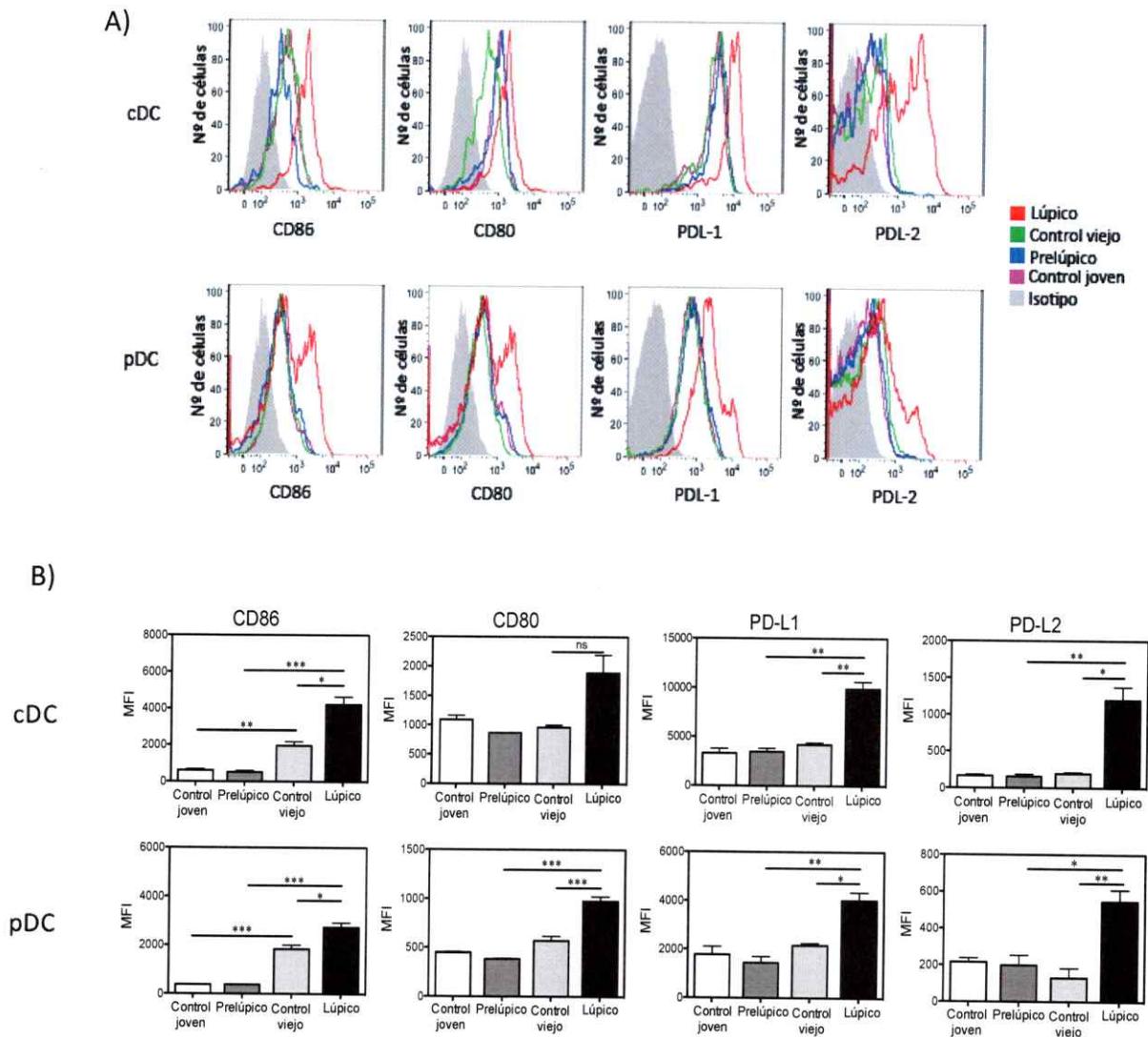
La funcionalidad de las DCs está dada en parte por la expresión de moléculas de coestimulación las que coordinan una respuesta de inmunidad o tolerancia. En esta parte del estudio nos enfocamos principalmente en el bazo porque es el órgano donde aparece claramente que las pDC se encuentran aumentadas en comparación a ratones prelúpicos y controles, además, este órgano refleja en parte lo que está ocurriendo en la sangre. Determinamos la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en cDC y pDC de bazo de los diferentes grupos de ratones. La Fig. 3A muestra un ejemplo representativo de la superposición de histogramas para cada uno de los marcadores de activación evaluados en cDC y pDC en ratones lúpicos, prelúpicos y controles. La Fig. 3B muestra el análisis estadístico de las intensidades medias de fluorescencia provenientes de al menos 7 experimentos independientes similar al mostrado en 3A. En esta figura observamos que en general ambas poblaciones de DCs provenientes de ratones lúpicos incrementan significativamente la expresión de CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en comparación a las DCs provenientes de ratones prelúpicos o controles. Cabe notar que las moléculas de co-estimulación CD86 y CD80 permiten visualizar 2 subpoblaciones de porcentajes similares en las pDC de los ratones lúpicos que no se observan en las cDC de estos mismos ratones. Las moléculas PD-L1 y PD-L2 también se expresan en forma heterogénea tanto en cDC como pDC.

Trabajos recientes han vinculado a los receptores SLAM, ubicados en el locus de susceptibilidad *Sle1/Nba2*, con el desarrollo del lupus (Calpe et al, 2008; Jorgensen et al, 2010). Al evaluar la expresión de los receptores SLAM para los cuales existen anticuerpos, es decir SLAM F1, F2, F3 y F6, encontramos que las cDC y pDC que provienen del bazo de ratones controles y prelúpicos expresan todos los receptores SLAM en forma heterogénea. Como se muestra en la figura 4, las cDC del bazo de ratones lúpicos aumentan significativamente la expresión de SLAM F1 (de un 10 a un 40%) y disminuyen la de SLAM F3 comparado a ratones prelúpicos y controles (de un 80 a un 60%), mientras que en las pDCs lúpicas sólo se ve afectada la expresión de SLAM F3 donde alrededor de la mitad de las pDC aumentan este receptor. La figura 4B muestra la cuantificación de estos datos.

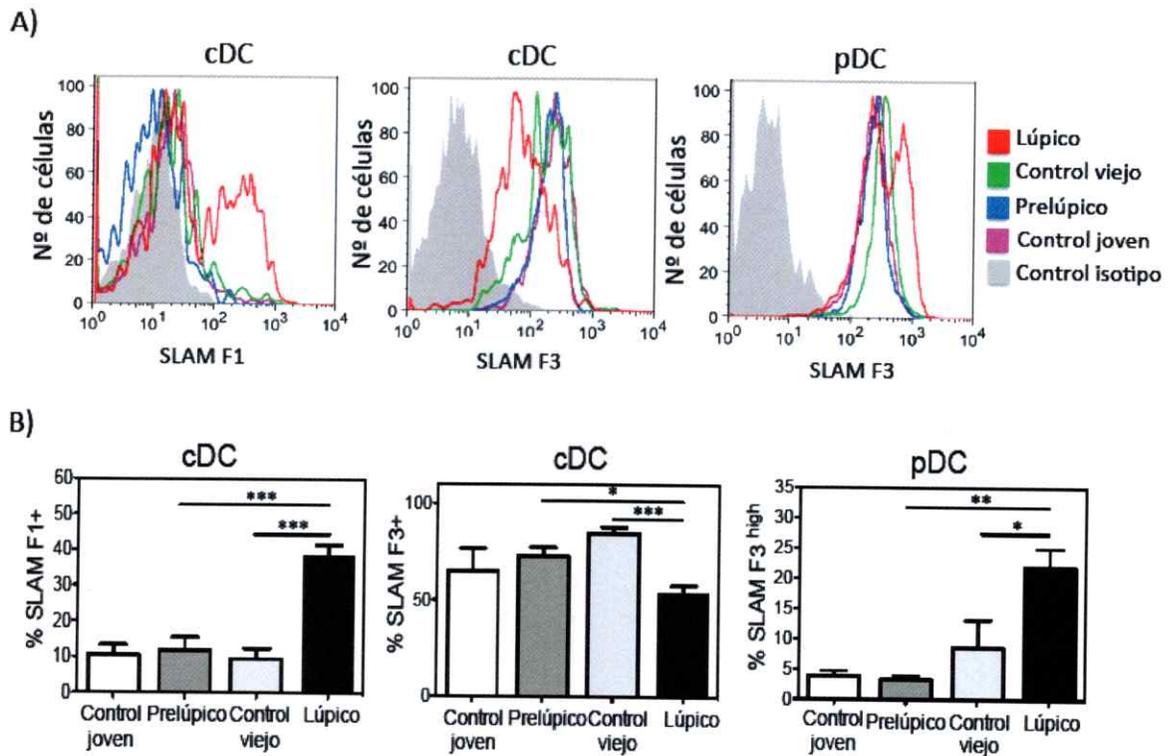
El dominio citoplasmático de los receptores SLAM poseen un motivo ITSM el cual es reconocido por las proteínas adaptadoras SAP e EAT-2. Se ha descrito que SAP se expresa en LT, LB y células NK mientras que EAT-2 se expresa en DCs, células NK y LB (Calpe et al, 2008). Para evaluar la expresión relativa de EAT-2 en cDC y pDC de bazo de los distintos grupos de ratones, las DCs fueron aisladas mediante cell sorter en base a los marcadores CD11c y B220 para discriminar entre cDC y pDC. La Fig. 5 muestra que las cDC de bazo de ratones lúpicos y prelúpicos expresan significativamente mayores niveles de la proteína adaptadora EAT-2 comparado con las cDC que provienen de ratones controles (Figura 5). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas

en la expresión relativa de EAT-2 en las pDCs provenientes de los distintos grupos de ratones (datos no mostrados).

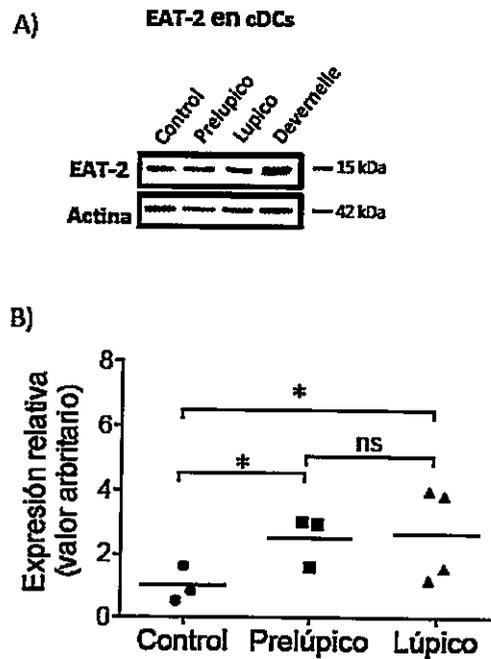
En conjunto estos resultados demuestran que las cDC y pDC de bazo de ratones lúpicos presentan un fenotipo activado comparado a las DCs control y muestran además diferencias en la expresión de SLAM F1 y la proteína adaptadora EAT-2, sugiriendo que ambas poblaciones de DCs pueden tener participación en el desarrollo del lupus.



**Figura 3. Las células dendríticas provenientes de ratones lúpicos presentan un fenotipo hiperactivado comparado a DCs de ratones prelúpicos y controles.** Las DCs se obtuvieron de bazo de ratones de cada uno de los grupos de ratones en estudio y se analizó por citometría de flujo los marcadores de activación de DCs: CD86, CD80, PDL-1 y PDL-2. A) Superposición de histogramas de fluorescencia para los marcadores indicados en una ventana CD11c+B220<sup>-</sup> (cDC) y CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup> (pDC). Experimento representativo de 7 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la IMF de células positivas de 7 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student. \*P<0,05. \*\*P<0,001. \*\*\*P<0,0001.



**Figura 4. cDC y pDC de ratones lúpicos muestran diferencias en la expresión de SLAM F1 y SLAM F3.** Las DCs se obtuvieron de bazo de ratones de cada uno de los grupos de ratones en estudio y se analizó por citometría de flujo la expresión de SLAMF1, SLAM F2, SLAM F3 y SLAM F6. A) Superposición de histogramas de fluorescencia para SLAM F1 y SLAM F3. Las cDC se analizaron en una ventana CD11c+B220- mientras que las pDC se analizaron en una ventana CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>. Experimento representativo de 5 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio ± error estándar del porcentaje de células positivas de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test T-Student. \*P<0,05. \*\*P<0,001. \*\*\*P<0,0001.



**Figura 5. cDC de ratones pre-lúpicos y lúpicos sobre-expresan EAT-2 comparado con ratones controles.** Las cDC de bazo de ratones pre-lúpicos, lúpicos y controles se purificaron mediante cell sorting de acuerdo a la expresión de B220 y CD11c. Como control positivo se usó el lisado celular de una línea celular B llamada Devernelle. **A)** Imagen representativa de al menos 3 experimentos de Western Blot, que ilustra los carriles correspondientes a EAT-2 y actina en cDC de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. **B)** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de EAT-2 observada mediante Western Blot. n=3 para controles, n=3 para pre-lúpicos, y n=4 para lúpicos. Los resultados fueron normalizados a la expresión de actina y son presentados relativos a la expresión de EAT-2 en ratones controles. El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student. \*p < 0,05 ns: no significativo.

### **3.3 Hiperactivación de los linfocitos B y T durante el desarrollo del lupus.**

Dentro de los tipos de celulares que han sido implicados en el LES, los linfocitos B son fundamentales para el desarrollo de esta enfermedad debido a que producen los auto-anticuerpos patogénicos. Sin embargo, los linfocitos B no solo pueden transformarse en células productoras de anticuerpos, sino además pueden participar en la respuesta inmune como células presentadoras de antígeno capaces de activar los linfocitos T. Para ello necesitan expresar moléculas de co-estimulación además de las moléculas de presentación antigénica. La Fig. 6 muestra el análisis de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en los distintos grupos de ratones, y allí observamos que sólo los linfocitos B que provienen del bazo de ratones lúpicos aumenta significativamente la expresión de CD86 y CD80 mientras que para PD-L1 y PD-L2 solo una pequeña proporción de los linfocitos B expresan estos receptores y no se muestran cambios durante el desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte los receptores SLAM son importantes para las interacciones celulares entre las diferentes componentes del sistema inmune y han sido involucrados en enfermedades autoinmunes, por lo tanto nos resultó interesante determinar si su expresión en los linfocitos B se correlaciona con el desarrollo del lupus. Encontramos que el 100% de los LB expresan los receptores SLAM F1, F2, F3 y F6 con intensidades medias de fluorescencia intermedias (datos no mostrados). Los LB que provienen del bazo de ratones lúpicos expresan niveles de SLAM F1 significativamente mayores que los LB de ratones prelúpicos y controles (Figura 7). En paralelo determinamos la

expresión de las proteínas adaptadoras de este receptor, SAP y EAT-2, en los LB de los distintos grupos de ratones, las cuales son esenciales para la activación de la vía de transducción de señales de las moléculas SLAM. El análisis densitométrico de los western blot para SAP y EAT-2 demostró que los LB de bazo de ratones lúpicos expresan mayores niveles de ambas proteínas en comparación con LB provenientes de ratones controles y prelúpicos (Figura 8). En conjunto estos resultados indican que los LB de bazo de ratones lúpicos presentan una sobre activación de la vía SLAM F1, probablemente debido a un número mayor de interacciones con la población de cDC que presentan un aumento considerable de este receptor.

Otra población importante en el bazo que contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes, son los linfocitos T. En condiciones no inflamatorias, la mayor parte de los LT CD4+ presentes en el bazo se caracterizan por una baja frecuencia de linfocitos activados. En contraste, los LT CD4+ que provienen del bazo de ratones lúpicos poseen un fenotipo activado, es decir son CD25+, CD69+, PD-1+ y negativos para CD62L, tal como se muestra en las Figs. 9A y 9B. Con el objetivo de determinar las características funcionales de estos LT activados, estas células fueron activadas por 4h de manera policlonal con PMA mas ionomicina en presencia de un bloqueador de la secreción de proteínas (Brefeldina A) y se realizó un marcaje intracelular para citoquinas. La Fig. 9C muestra un aumento notable en el porcentaje de células IFN- $\gamma$ + e IL10+ en los LT CD4+ provenientes de ratones lúpicos comparado a ratones prelúpicos y controles.

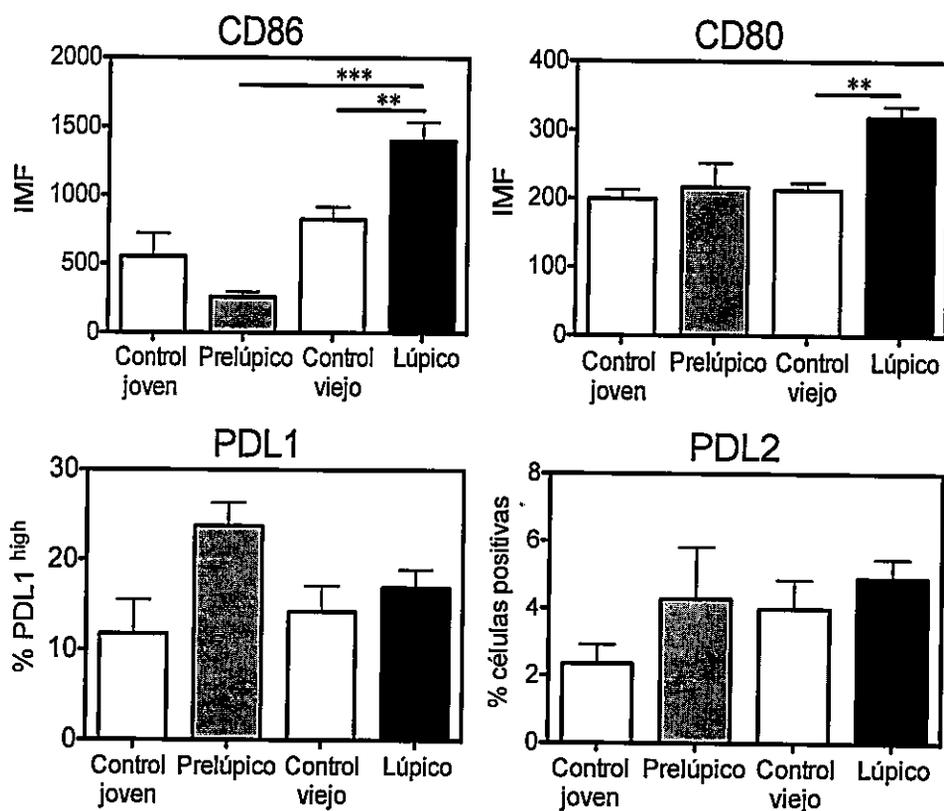
Otros receptores importantes en el contacto celular que podrían estar involucrados en la activación de los LT son los receptores SLAM. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo muestran que los LT poseen una expresión heterogénea de los receptores SLAM. La Fig. 10 muestra que los LT CD4+ de bazo de ratones lúpicos aumentan significativamente la expresión de SLAM F1 y F6 en comparación con los LT CD4+ de bazo de ratones prelúpicos y controles. En conjunto estos resultados nos indican que LB y LT provenientes de bazo de ratones lúpicos poseen un estado de sobre-activación comparado a los linfocitos que provienen de ratones prelúpicos y controles, y la expresión aumentada de SLAM F1 en los ratones lúpicos en todas las poblaciones celulares estudiadas sugiere que este receptor podría estar involucrado en este estado de hiper-activación linfocitaria. Sin embargo, se necesitan anticuerpos bloqueadores de esta interacción para demostrarlo.

Se ha documentado que deficiencias cuantitativas y/o cualitativas en la población de linfocitos T reguladores (Treg) podría conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Bonelli et al, 2010; Sakaguchi et al, 2006). Para determinar el papel de los Treg en el desarrollo del lupus determinamos los porcentajes de LT CD4+Foxp3+ en el bazo de ratones lúpicos, prelúpicos y controles. Nuestros resultados muestran que el bazo de ratones lúpicos posee un incremento significativo del porcentaje de Treg comparado con el bazo de ratones prelúpicos y controles (Figura 11A). Sin embargo, cuando evaluamos la expresión de CD25, un marcador de los Treg, en conjunto con la expresión del factor de transcripción Foxp3,

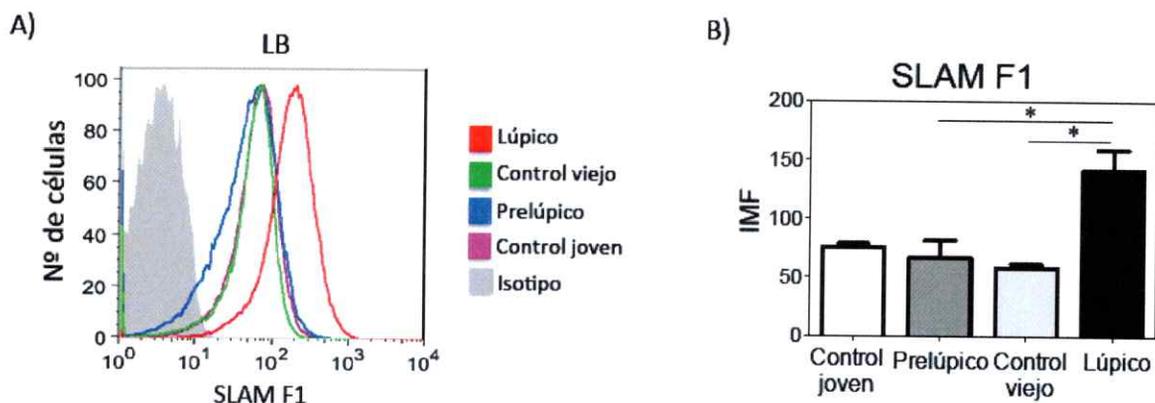
encontramos que el incremento se debe principalmente a una población CD4+Foxp3+CD25- que no ha sido reportada en la literatura en modelos murinos pero que si se ha descrito en humanos con lupus activo (Horwitz, 2010).

Por otra parte, aislamos mediante selección inmunomagnética los Treg CD4+Foxp3+CD25+ del bazo de ratones lúpicos y controles para determinar si estos linfocitos poseían una función supresora normal. Para ello, los Treg aislados por la alta expresión de CD25, fueron puestos en presencia de LT vírgenes que se activaron en forma policlonal con anti-CD3 y DCs y se evaluó la proliferación de los LT vírgenes con y sin Treg. La Fig. 12 muestra que los Treg son funcionales ya que son capaces de suprimir la proliferación de LT efectores in vitro. Desgraciadamente, técnicamente es imposible separar la población de LT CD4+Foxp3+CD25- por lo tanto no pudimos determinar si son funcionales o no. Al evaluar el fenotipo de los Treg provenientes del bazo de los distintos grupos de ratones, encontramos que ambas poblaciones de Treg (CD25+ o CD25-) que provienen de ratones lúpicos aumentan significativamente los niveles de expresión de CD69 y PD-1 mientras que pierden la expresión de CD62L en comparación con Treg de ratones prelúpicos y controles, por esta razón se decidió graficar la población Treg CD4+Foxp3+ (Fig. 13). Este es un resultado aberrante puesto que sugiere que los Treg se encontrarían en un estado activado/efector más bien que supresor. Al evaluar la expresión de los receptores SLAM en los Treg observamos que tanto los linfocitos CD4+Foxp3+CD25+ como los linfocitos CD4+Foxp3+CD25- expresan los receptores SLAM analizados (SLAMF1, F2, F3 y F6) con intensidades medias de

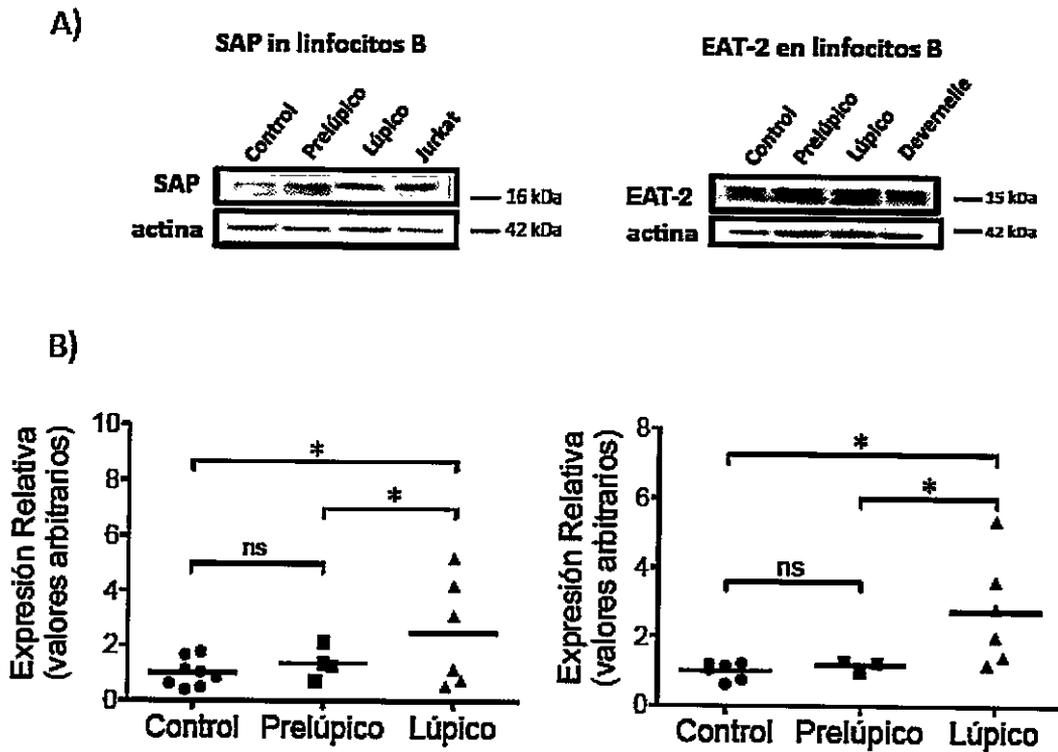
fluorescencias bajas (datos no mostrados). Debido a que ambas poblaciones de LTreg CD25+ y CD25- que provienen de bazo de ratones lúpicos disminuyen significativamente la expresión de el receptor SLAM F1, se graficó la expresión de este receptor en la población de Treg CD4+Foxp3+ (Figura 13). Estos resultados sugieren que los Treg provenientes de ratones lúpicos al tener menores niveles de expresión de SLAM F1, establecerían un menor número de interacciones con las células que expresan estos receptores o bien establecerían contactos de menor afinidad afectando las vías de transducción de señales y por tanto su capacidad supresora, sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para comprobar esta hipótesis.



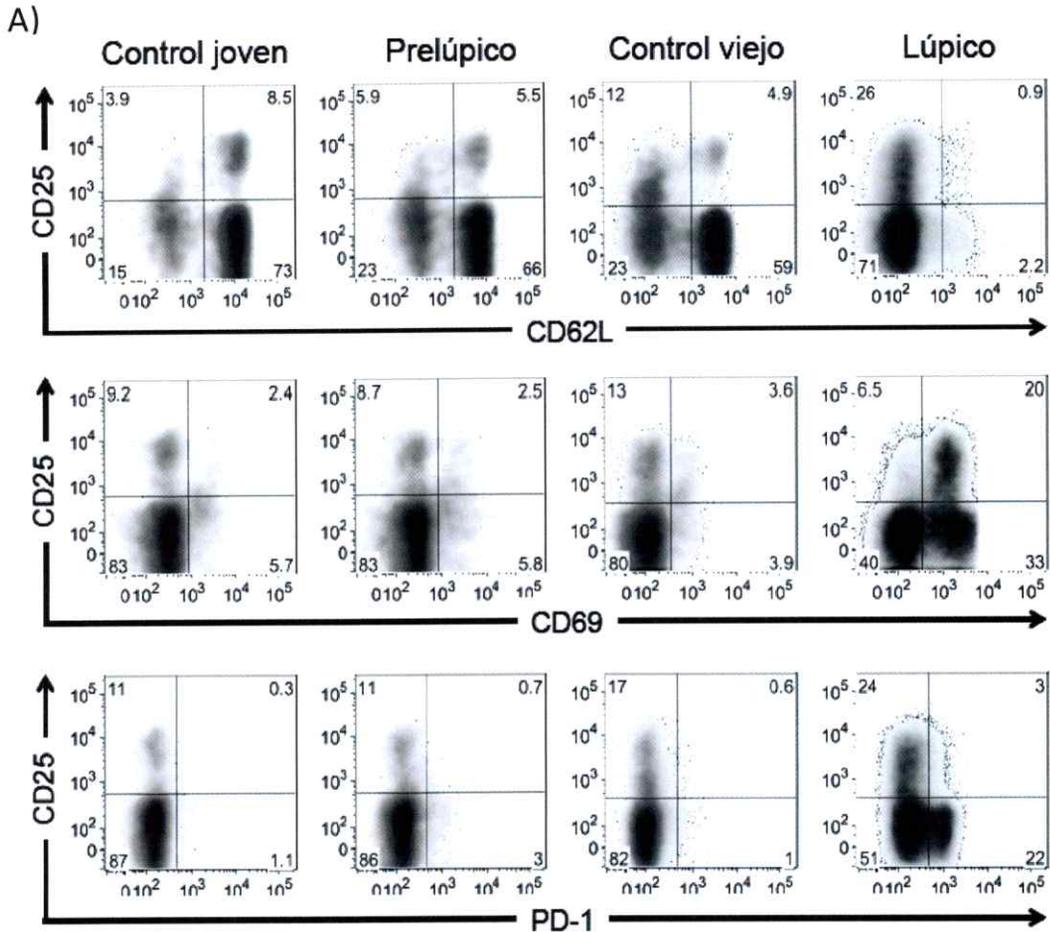
**Figura 6. Linfocitos B provenientes de bazo de ratones lúpicos poseen un fenotipo activado comparado con LB que provienen de ratones prelúpicos y controles.** Se obtuvieron esplenocitos pertenecientes a cada grupo de ratones y se determinó mediante citometría de flujo la expresión de B220, CD11c, CD86, CD80, PDL-1 y PDL-2. Los LB se analizaron en una ventana CD11c-B220+ en los distintos grupos de ratones. Las barras representan el promedio o la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) según corresponda  $\pm$  error estándar de las células positivas de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test t-Student. \* $P < 0,05$ . \*\* $P < 0,001$ . \*\*\* $P < 0,0001$ .



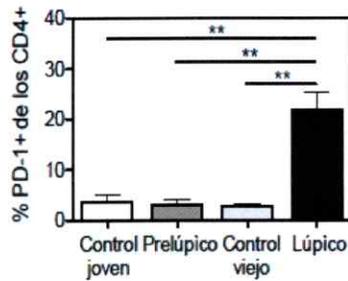
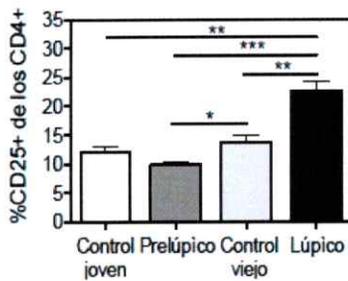
**Figura 7. Linfocitos B de ratones lúpicos expresan mayores niveles de SLAM F1 que LB de ratones controles y prelúpicos.** Esplenocitos pertenecientes a cada grupo de ratones fueron analizados mediante citometría de flujo para la expresión de SLAM F1 en una ventana B220+CD19+CD11c- correspondiente a los linfocitos B. A) Superposición de histogramas de fluorescencia para SLAM F1. B) Cuantificación de resultados mostrados en A. Los datos se grafican como el promedio  $\pm$  error estándar y son representativos de al menos 5 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el test t Student, \*P< 0,05. \*\*P<0,001.



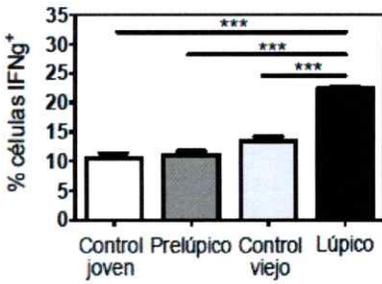
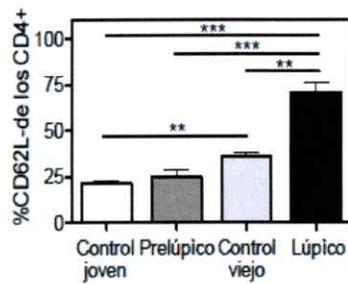
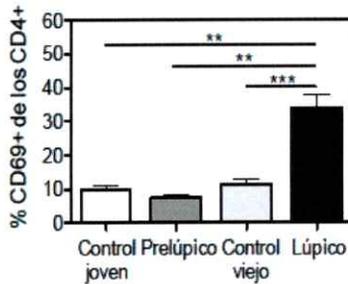
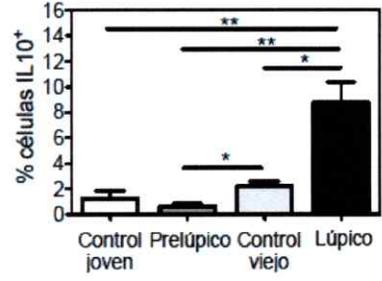
**Figura 8.** Linfocitos B de ratones lúpicos sobreexpresan SAP y EAT-2 comparados a linfocitos B de ratones pre-lúpicos y controles. Los LB de bazo de ratones pre-lúpicos, lúpicos y controles se purificaron mediante cell sorting de acuerdo a la expresión de B220 y CD79b. Se utilizaron los lisados celulares de Jurkat y Devernelle como controles positivos. A) Figura representativa de al menos 3 Western Blot correspondientes a SAP/EAT-2 y actina en LB de bazo de ratones controles, pre-lúpicos y lúpicos. B) Análisis cuantitativo de la expresión relativa de SAP e EAT-2 observada mediante Western Blot. Cada punto representa un experimento independiente. Los resultados fueron normalizados respecto de la expresión de actina y son presentados relativos a la expresión de SAP en ratones controles. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de Student. \* $p < 0,05$  ns: no significativo.



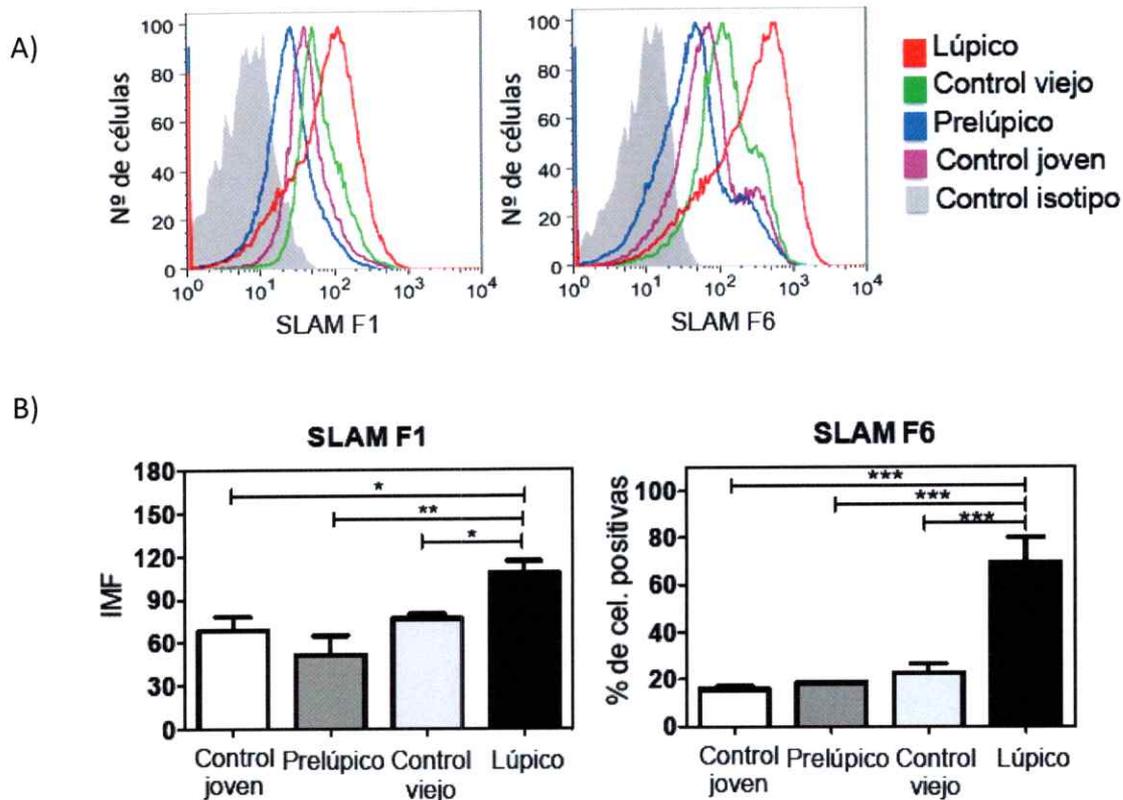
B)



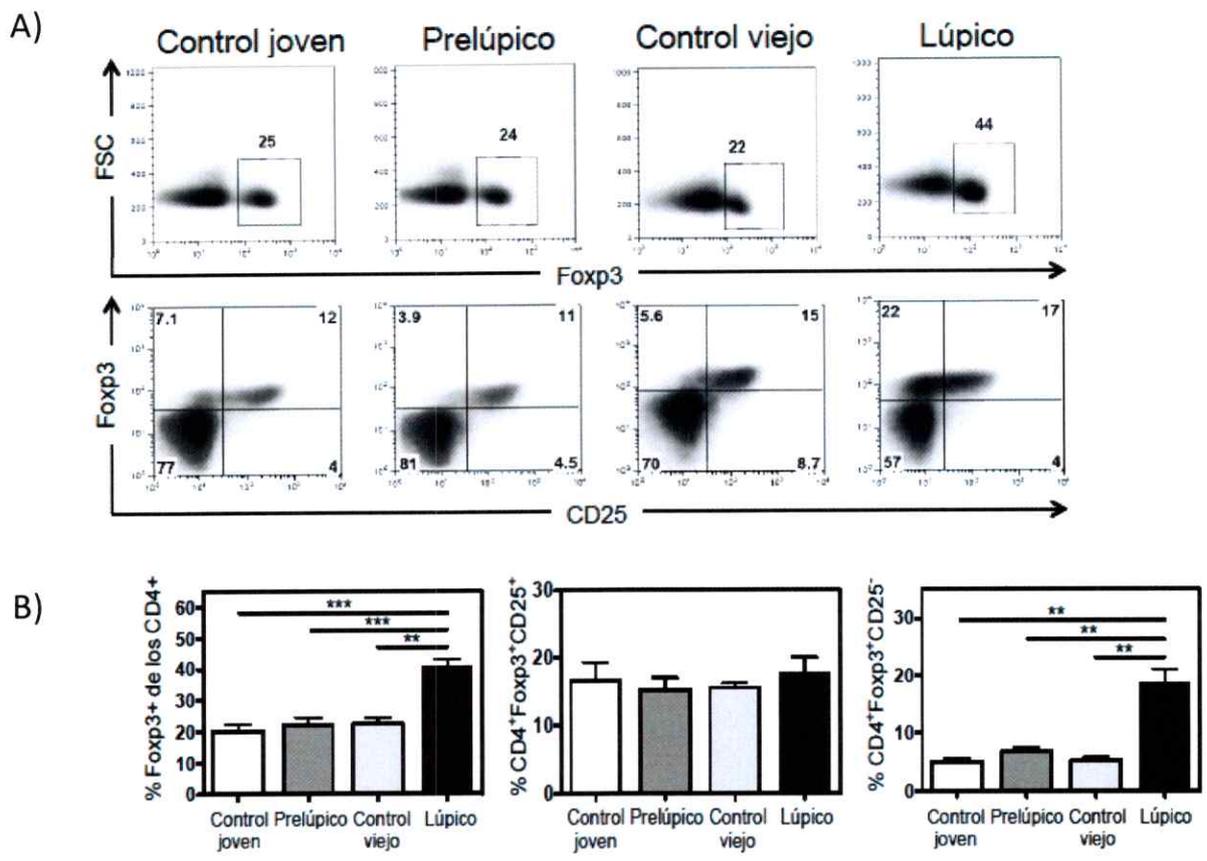
C)



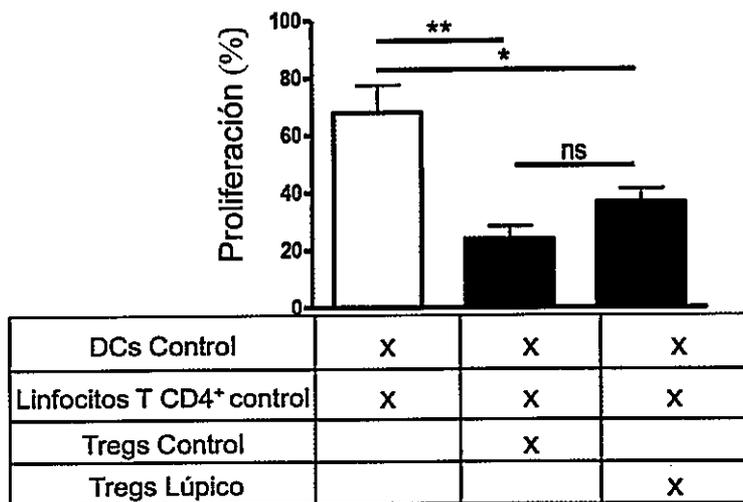
**Figura 9. Linfocitos T CD4+ de bazo de ratones lúpicos presentan un fenotipo activado comparado a LT CD4+ de ratones controles o prelúpicos.** A) Gráficos de citometría de flujo de la expresión de CD25, CD62L, CD69 y PD-1 en una ventana de linfocitos T CD4+ de bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Los números al interior de cada grafico representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Los resultados son representativos de 7 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar del porcentaje de células positivas para cada marcador analizado. C) La expresión de IL10 e IFN- $\gamma$  fue analizada intracelularmente por citometría de flujo en LT CD4+ de bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos activados con PMA + Ionomicina + Brefeldina por 4 horas. El análisis estadístico se realizó mediante un test T de Student.\*P<0,05. \*\*P<0,001. \*\*\*P<0,0001.



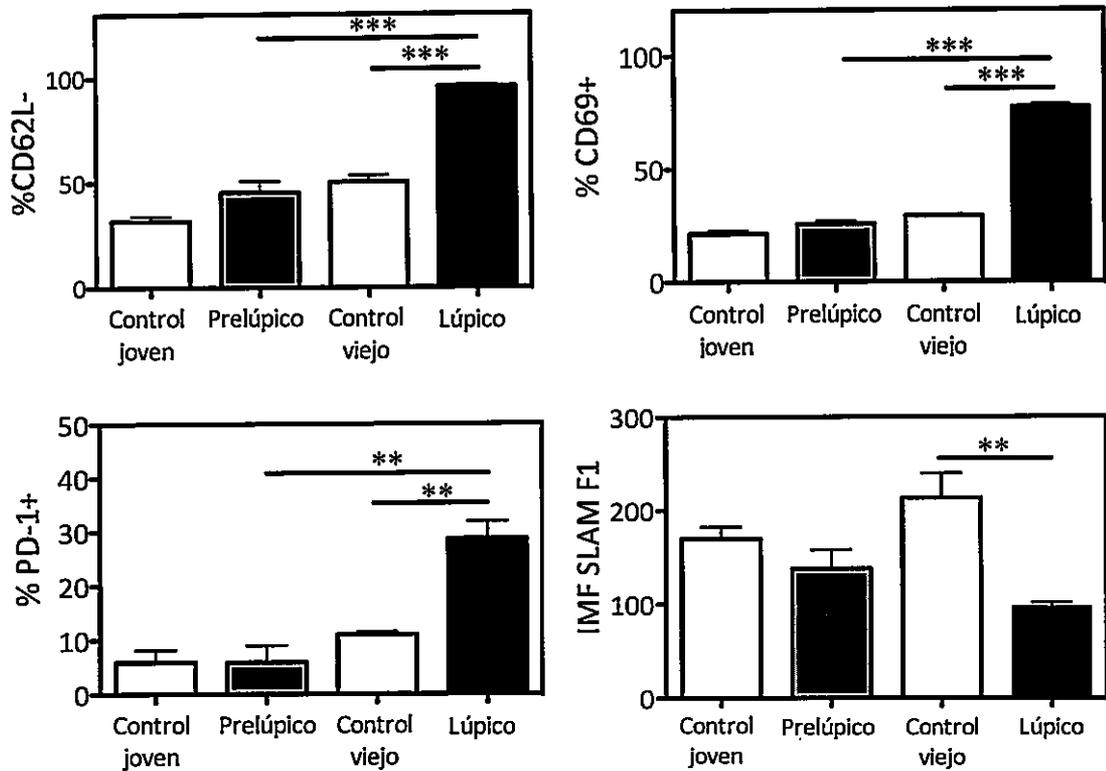
**Figura 10. LT CD4<sup>+</sup> de bazo de ratones lúpicos sobre-expresan SLAM F1 y F6 comparado a LT CD4<sup>+</sup> de ratones controles y prelúpicos.** Se obtuvieron esplenocitos pertenecientes a cada grupo de ratones y se determinó mediante citometría de flujo la expresión en la superficie de SLAMF1, SLAM F2, SLAM F3 y SLAM F6. A) Superposición de histogramas de fluorescencia para SLAM F1 y SLAM F6 en una ventana CD3+CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>) en los distintos grupos de ratones. Experimento representativo de 6 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la intensidad media de fluorescencia (IMF) o del porcentaje de células positivas según corresponda de 7 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de Student. \*P<0,05. \*\*P<0,001. \*\*\*P<0,0001.



**Figura 11. El bazo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de LTregs CD25-comparado a ratones control y prelúpicos.** A) Gráficos de citometría de flujo de la expresión de Foxp3 y CD25 en esplenocitos provenientes de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. El panel superior muestra la expresión de Foxp3 en una ventana CD4+. El panel inferior muestra la expresión de Foxp3 y CD25 en una ventana CD4+. Los números al interior de cada grafico representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Los resultados son representativos de 7 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar del porcentaje de células positivas para cada marcador analizado. El análisis estadístico se realizó mediante un test t Student. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 12. Linfocitos T reguladores CD25<sup>+</sup> de ratones lúpicos presentan actividad supresora normal.** Gráfico de barras que representa el porcentaje promedio de la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> control marcados con CFSE activados con DCs y anti-CD3, en presencia o ausencia de Tregs provenientes de ratones controles o lúpicos. n=3. t-student no pareado (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01, ns: no significativo).



**Figura 13. Linfocitos T reguladores de ratones lúpicos poseen un fenotipo activado.** Los esplenocitos provenientes de los diferentes grupos de ratones fueron marcados en la superficie con anticuerpos específicos para CD4, CD25, CD62L, PD-1, SLAM F1, SLAM F2, SLAM F3 y SLAM F6. Una vez fijadas, las células fueron marcadas intracelularmente con anti-Foxp3. Las barras representan el promedio o la IMF según corresponda  $\pm$  error estándar del porcentaje de LTreg positivos para cada uno de los marcadores de activación. Análisis de 7 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test t Student. \* $P < 0,05$ . \*\* $P < 0,001$ . \*\*\* $P < 0,0001$ .

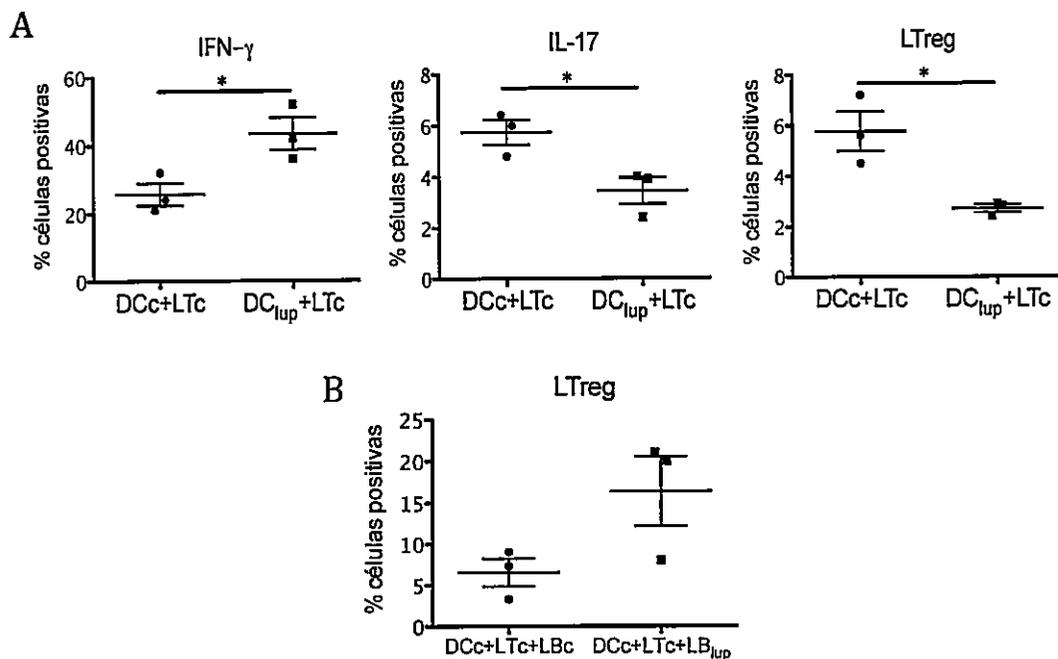
### **3.4 Células dendríticas provenientes de ratones lúpicos inducen la diferenciación de los linfocitos T a un fenotipo Th1.**

Para determinar el efecto de las DCs provenientes de ratones lúpicos sobre los linfocitos T vírgenes, se co-cultivaron ambas poblaciones en presencia de  $\alpha$ -CD3 y luego de 5 días se determinó por citometría de flujo la producción de las citoquinas INF- $\gamma$  e IL-17 y la generación de Treg. Como se observa en la Fig. 14, las DCs que provienen de bazo de ratones lúpicos inducen un aumento significativo de la producción de IFN- $\gamma$  y una disminución de la producción de IL-17 en los LT provenientes de ratones controles, mientras que DCs que provienen de los ratones controles producen el efecto contrario en los LT, demostrando que las DCs de ratones lúpicos inducen preferencialmente un fenotipo tipo TH1 en los LT vírgenes. Por otra parte, las DCs que provienen de bazo de ratones lúpicos inhiben la diferenciación de LT de ratones controles a Treg.

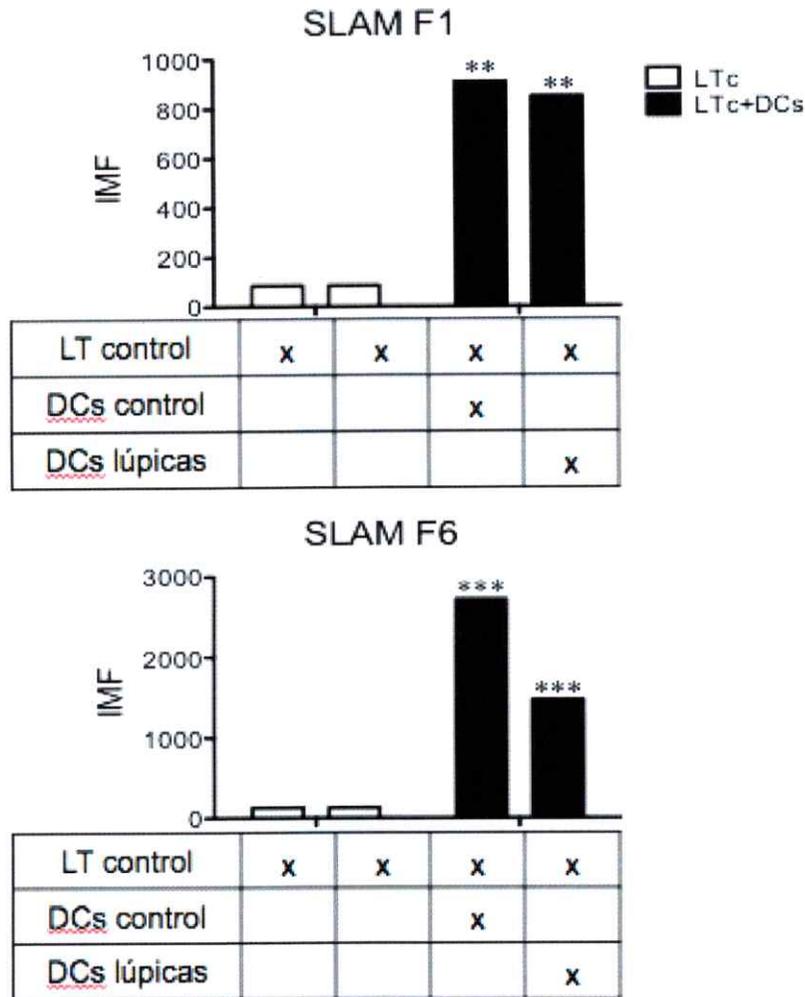
En un trabajo anterior de nuestro laboratorio (Moore et al, 2010) demostramos que los linfocitos B son necesarios para la diferenciación de LT a Treg. Por lo tanto en este trabajo realizamos ensayos de co-cultivos de DCs con LT y LB. Como se muestra en la figura 14B, los LB que provienen del bazo de ratones lúpicos producen un aumento en el porcentaje de los Treg lo que permitiría explicar el resultado obtenido en el bazo de los ratones lúpicos donde los LB serían los responsables del aumento de Treg en los ratones lúpicos (Fig. 14B).

Adicionalmente estudiamos si las DCs que provienen de bazo de ratones lúpicos modulan la expresión de los receptores SLAM en los linfocitos. Para esto, analizamos

por citometría de flujo la expresión de estos receptores en LT de bazo de ratones controles antes y después de ser cultivados con DCs que provienen de ratones controles o lúpicos. Como se observa en la figura 15, la activación de linfocitos T con DCs de ratones controles y lúpicos induce la expresión de SLAM F1 y F6 en los linfocitos T, sin embargo, se observa las DCs de ratones lúpicos producen un incremento mucho menor de la expresión de SLAM F6 en los linfocitos controles (Fig. 15). Este efecto no se correlaciona con los datos obtenidos en linfocitos T de bazo de ratones lúpicos (figura 10) lo que puede ser explicado por el hecho de estar comparando experimentos realizados *in vitro* con experimentos *in vivo*.



**Figura 14. Las DCs de bazo de ratones lúpicos inducen un fenotipo Th1 en linfocitos T vírgenes.** Las DCs provenientes de bazo de ratones lúpicos o controles fueron co-cultivadas por 5 días con LT CD4+CD25<sup>-</sup>. A) Al final del co-cultivo se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células que producen IFN $\gamma$ , IL-17 y, el porcentaje de Treg (Foxp3+) en una gate CD3+CD4+ (n=3). B) Análisis del porcentaje de Treg en co-cultivos de DC con LT y LB provenientes de bazo de ratones lúpicos o controles (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante el test t student (\*p < 0,05).



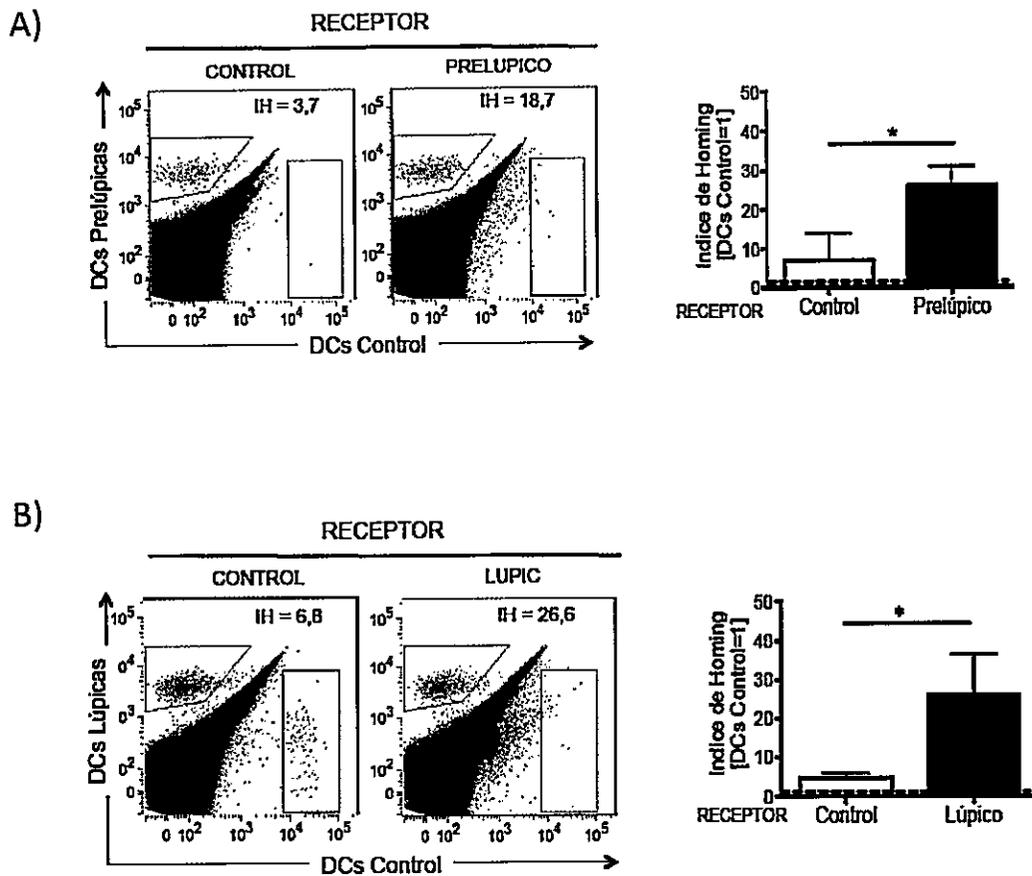
**Figura 15. Las DCs de bazo de ratones lúpicos no inducen SLAM F1 en linfocitos T vírgenes.** Las DCs provenientes de bazo de ratones lúpicos o controles fueron cocultivadas por 5 días con LT CD4+CD25-. Se analizó la expresión de SLAM F1 y F6 al comienzo (O) y al final del cultivo con DCs ( $\Delta$ ) que provienen de bazo de ratones controles o lúpicos. El análisis estadístico se realizó mediante el test t student (\*\*P<0,001, \*\*\*P<0,0001).

### **3.5 Las DCs de ratones lúpicos migran preferencialmente al bazo comparado a DCs provenientes de ratones controles.**

A continuación nos preguntamos si las DCs provenientes de ratones lúpicos presentan defectos en la migración que permitan explicar su mayor localización en el bazo. Para esto, células dendríticas de ratones lúpicos, prelúpicos y controles fueron aisladas por cell sorting después de enriquecer la preparación de células provenientes del bazo eliminando linfocitos B y T por selección inmunomagnética. En estos experimentos utilizamos células dendríticas totales, es decir cDC+pDC que marcamos con diferentes moléculas fluorescentes de manera de realizar experimentos de homing competitivos. El análisis se realizó por citometría de flujo. La Fig. 16 A y B muestra 2 experimentos representativos de 3 experimentos cada uno donde se comparó la migración de DCs de ratones lúpicos o prelúpicos versus DCs de ratones controles. A la derecha se muestra el análisis estadístico de 3 experimentos independientes. Se determinó el índice de homing (IH) a las 48 horas (el IH nos indica cuantas veces migra una célula con respecto a la otra). Al co-inyectar DCs de ratones controles y ratones prelúpicos, se observó que las DCs que provienen de ratones prelúpicos migran en mayor proporción al bazo que las DCs control, independiente del ratón receptor. Sin embargo se observaron mayores índices de homing cuando el receptor es un ratón prelúpico. Cuando se co-inyectan DCs de ratones controles con DCs de ratones lúpicos observamos que las DCs de ratones lúpicos migran más al bazo que las células control independiente del ratón receptor. Las DCs lúpicas migran 5 veces más al bazo que las

células de ratones controles cuando el receptor es un ratón control y casi 30 veces cuando el receptor es un ratón lúpico.

Estos resultados sugieren fuertemente que las DCs de bazo de ratones lúpicos poseen receptores de homing a bazo que están menos presentes o ausentes en las DCs de ratones que no desarrollan lupus. Por otra parte esta propiedad de homing se desarrolla temprano durante la enfermedad ya que las DCs de los ratones prelúpicos muestran el mismo comportamiento.



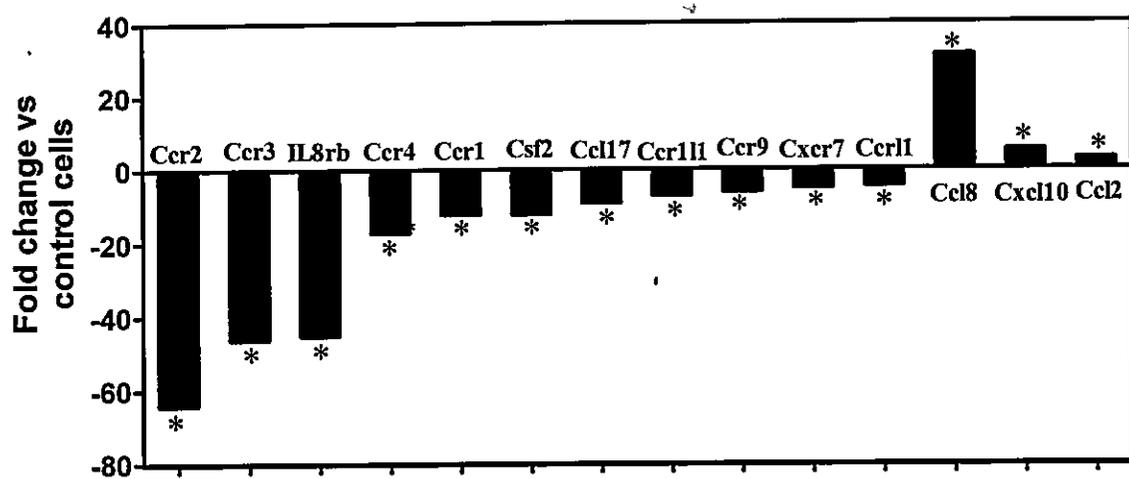
**Figura 16. Las DCs de bazo de ratones lúpicos y prelúpicos migran mas eficientemente al bazo que las DCs control.** A) Gráficos de citometría de flujo de un experimento representativo de un receptor control y uno prelúptico los cuales fueron inyectados con igual número de DCs aisladas de bazo de ratones controles marcadas con calceina y con DCs de bazo de ratones prelúpicos marcadas con TRITC. El número al interior de cada grafico representa el IH a las 48 horas después de la transferencia adoptiva (izquierda). Los gráficos de barras muestran la media del índice de homing para cada condición  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (t de Student y corrección de Wilcoxon \*,  $p < 0,05$ ). B) Gráficos de citometría de flujo de un experimento representativo de un receptor control y uno lúpico los cuales fueron inyectados con igual número de DCs control marcadas con calceina y con DCs lúpicas marcadas con TRITC. El número al interior de cada grafico representa el IH a las 48 horas después de la transferencia adoptiva (izquierda). Los gráficos de barras muestran la media del índice de homing para cada condición  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes (t de Student y corrección de Wilcoxon \*,  $p < 0,05$ ).

### **3.6 Receptores de quimioquinas y quimioquinas presentes en las células dendríticas de bazo.**

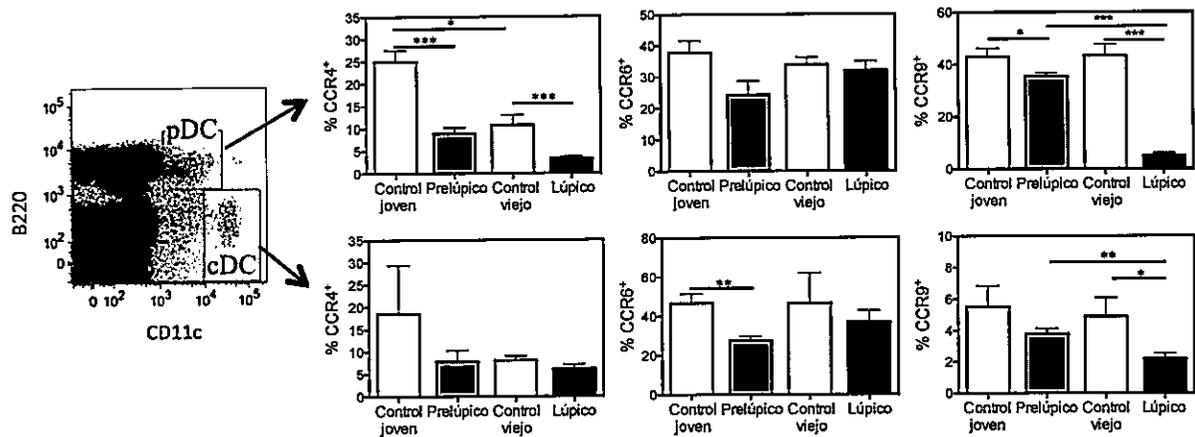
Una función esencial de las células dendríticas es la vigilancia inmunológica para lo cual tienen la capacidad de migrar desde la sangre a los tejidos y de los tejidos a los órganos linfoides presentes a lo largo de todo el individuo. Esta función es regulada por quimioquinas, proteínas de bajo peso molecular con función quimiotáctica que actúan a través de receptores expresados en la membrana plasmática. Ya que las DCs se acumulan en el bazo de los ratones que desarrollan lupus, analizamos el patrón de expresión génica de quimioquinas y receptores de quimioquinas de las DCs de bazo provenientes de ratones lúpicos, prelúpicos y controles. Los resultados obtenidos por PCRArrays muestran que las DCs lúpicas aumentan significativamente la expresión de los mRNA de las quimioquinas CXCL10 y CCL8 y disminuyen la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR9, CXCR2 y CXCR1 comparado a DCs prelúpicos y controles. (Fig. 17). La pérdida de expresión génica de los receptores de quimioquinas en las DCs lúpicas sugiere que éstas son incapaces de responder a señales quimioattractivas.

Para comprobar los resultados de expresión génica, se estudió la expresión de los receptores CCR4, CCR6 y CCR9 en DCs de bazo de ratones lúpicos, prelúpicos y controles. El análisis de citometría de flujo demostró que en condiciones basales entre un 30-50% de las pDC aisladas de ratones controles y prelúpicos expresan CCR4, CCR6 y CCR9 (datos no mostrados). Interesantemente, las pDCs de ratones lúpicos disminuyen

significativamente la expresión de CCR4 y CCR9 (Fig. 18). Un estudio reciente demostró que las pDC que expresan CCR9 transportan antígenos periféricos al timo para promover la tolerancia central (Hadeiba et al, 2012). Por lo tanto, es posible que las pDC de ratones que desarrollaron lupus, que pierden la expresión de CCR9, sean intrínsecamente ineficientes en inducir tolerancia central. Al analizar la expresión de los receptores de quimioquinas en cDC, demostramos que sólo aquellas cDC provenientes de ratones lúpicos presentan una disminución significativa de la expresión de CCR9 (Fig. 18).



**Figura 17. Expresión génica de receptores de quimioquinas y quimioquinas presentes en las DCs de bazo de ratones controles y lúpicos.** Las muestras de RNA fueron obtenidas de DCs de bazo de ratones lúpicos y controles purificadas por cell sorting y analizadas usando PCR Arrays. Los datos representan las veces de cambio relativas a la condición control, calculadas desde  $\Delta Ct$  normalizadas con los genes de housekeeping. Los transcritos del gráfico poseen al menos 2 veces de diferencia con respecto al control. La expresión génica fue detectada por RT-PCR en triplicados. (\* $p < 0.05$ ).

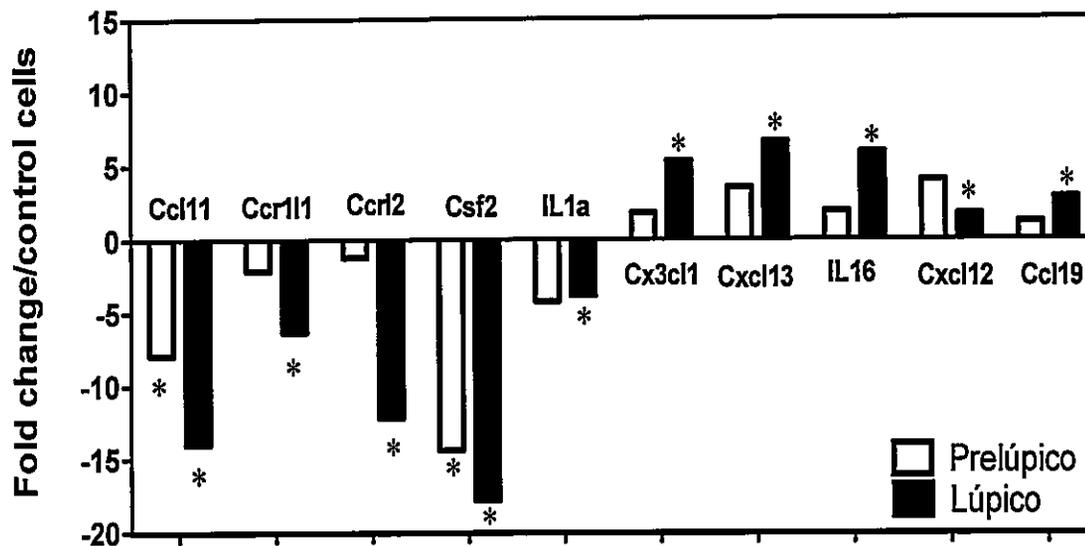


**Figura 18. Las DCs lúpicas pierden la expresión de CCR9 y CCR4.** Se obtuvieron esplenocitos pertenecientes a cada grupo de ratones y se determinó mediante citometría de flujo la expresión en la superficie de CCR6, CCR4 y CCR9 en cDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) y pDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>). Los resultados muestran el porcentaje de células positivas para cada receptor. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar del porcentaje de células positivas de 6 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test T Student. \*P<0,05. \*\*P<0,01. \*\*\*P<0,001.

### **3.7 El estroma de bazo de ratones lúpicos presenta quimioquinas capaces de atraer precursores de DCs.**

Nuestros resultados sugieren que los ratones lúpicos poseen un microambiente capaz de modular la distribución, y migración de diferentes tipos celulares tales como las DCs. Por esta razón se analizó por PCRarrays el patrón de expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas en cultivos de estroma de bazo provenientes de ratones lúpicos, prelúpicos y controles. Los estromas de bazo fueron obtenidos como se señala en Materiales y Métodos. La Fig. 19 demuestra que el estroma de bazo de ratones lúpicos presenta una elevada expresión de las quimioquinas CCL19, CXCL12 y de interleuquina 16 (IL-16) en comparación a estromas de bazo provenientes de ratones controles y prelúpicos.

En conjunto estos resultados sugieren que la acumulación de DCs en el bazo de ratones lúpicos se debe a una desregulación de señales quimioattractantes producidas por el estroma lúpico y por las DCs lúpicas. Adicionalmente, las DCs del bazo de ratones lúpicos disminuyen la expresión de muchos de los receptores que le permiten responder a señales quimioattractivas lo que podría influir en su permanencia en el bazo.



**Figura 19.** Expresión génica de receptores de quimioquinas y quimioquinas en células estromales de bazo de ratones lúpicos, prelúpicos y controles. Las muestras de RNA fueron obtenidas desde estroma de bazo de ratones lúpicos, prelúpicos y controles y fueron analizadas usando PCR Arrays. Los datos representan las veces de cambio relativas a la condición control calculadas desde  $\Delta Ct$  normalizadas con los genes de housekeeping. Los transcritos del gráfico poseen al menos 2 veces de diferencia con respecto al control. La expresión génica fue detectada por RT-PCR en triplicados. (\* $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSION

El LES es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos y la formación de complejos inmunes que se depositan en múltiples tejidos, generando inflamación y daño tisular. Aunque el LES es una enfermedad causada principalmente por linfocitos B, la hiper-activación de los linfocitos T se ha relacionado directamente con el desarrollo de esta enfermedad como una consecuencia de las anomalías observadas en las células presentadoras de antígeno y en deficiencias de los Treg (Gerli et al, 2009; Zhu et al, 2005). Adicionalmente, dado que las DCs juegan un papel central en la iniciación de la respuesta inmune y establecen un balance entre inmunidad y tolerancia, en este trabajo se decidió evaluar las diferentes subpoblaciones de DCs en el desarrollo del lupus en el modelo animal de esta enfermedad (NZBW)F1.

Las DCs tienen un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia periférica. La eliminación de esta población, genera un quiebre en los mecanismos de tolerancia hacia antígenos propios generando autoinmunidad (Fransen et al, 2010). Las cDC y pDC representan las dos principales sub-poblaciones de DCs, comparten algunas características como APCs sin embargo cumplen diferentes funciones en la respuesta inmune y por lo tanto podrían jugar distintos papeles en la patogénesis del lupus eritematoso sistémico. De las dos sub-poblaciones de DCs, se piensa que las pDC podrían tener un papel central en la patogénesis del LES, debido principalmente a la producción de IFN- $\alpha$ , citoquina que ha sido vinculada con la iniciación de esta

enfermedad (Bengtsson et al, 2000; Blanco et al, 2001; Dall'era et al, 2005; Liu et al, 2011). A pesar de que se han obtenido resultados controversiales en los recuentos de pDC de sangre periférica entre individuos sanos y pacientes con LES, es evidente de que existe una distribución alterada de esta población (Farkas et al, 2001; Jin et al, 2008; Migita et al, 2005). Otros estudios han documentado anormalidades en las cDC de pacientes con LES en cuanto al número (Crispin & Alcocer-Varela, 2007; Jin et al, 2008; Monrad et al, 2008), fenotipo y funcionalidad (Koller et al, 2004).

En este trabajo hemos demostrado que los ratones lúpicos (NZBW)F1 presentan un incremento en los porcentaje de pDC y cDC en bazo, sangre periférica y PLN en comparación con ratones controles y prelúpicos (Fig. 1). Sin embargo, al determinar el número absoluto de ambas poblaciones de DCs en los distintos grupos de ratones, sólo encontramos un aumento significativo de las pDC en bazo y sangre de ratones lúpicos, sugiriendo la existencia de un desequilibrio en la homeostasis o en la migración de las DCs tanto en el bazo de ratones lúpicos como en otros tejidos linfoides. Las alteraciones conciernen principalmente las pDC pero también se encuentran afectadas las cDC como se muestra en los otros órganos linfoides (Fig. 2). El origen de las DCs que se acumulan en el bazo podría ser un factor importante a considerar en el desarrollo del LES ya que cDC y pDC presentan características diferentes relativas a la capacidad para fagocitar células apoptóticas y necróticas, un elemento que debe ser considerado en la inducción de tolerancia (Banchereau & Steinman, 1998).

Las DCs pueden inducir inmunidad o tolerancia dependiendo de las circunstancias. La interacción de linfocitos T vírgenes con DCs inmaduras induce tolerancia periférica, por mecanismos que incluyen anergia/delección de linfocitos o la generación de LT reguladores (Banchereau et al, 2000), mientras que la activación de la respuesta inmune requiere que esta interacción se lleve a cabo en presencia de DCs activadas que se caracterizan por expresar mayores niveles de moléculas de histocompatibilidad y de coestimulación (Banchereau et al, 2000). El aumento de la diferenciación de monocitos (u otros precursores mieloides) hacia DCs, y el aumento de la expresión de moléculas de maduración/activación podría promover y mejorar la capacidad de las DCs lúpicas para activar a linfocitos T contribuyendo a la hiperactividad de estos linfocitos descrita en el LES.

En este trabajo demostramos que ambas poblaciones de DCs que provienen del bazo de ratones lúpicos sobre-expresan las moléculas de co-estimulación CD80 y CD86 en comparación con DCs que provienen de ratones prelúpicos y controles. El aumento del estado de activación de las DC lúpicas en ausencia de señales de peligro extrínsecos sugiere que estas células pueden convertirse en células presentadoras de auto-antígenos muy eficientes e inducir respuestas autoinmunes. Se ha descrito que el tratamiento simultáneo con anticuerpos bloqueadores para CD80 y CD86 antes de la aparición de los síntomas del lupus mejora significativamente la supervivencia y la gravedad de la enfermedad en modelos murinos de esta enfermedad (Kinoshita et al, 2000; Nakajima et al, 1995).

Se ha documentado que PD-1 y sus ligandos PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) entregan señales inhibitorias que mantienen el equilibrio entre la activación de linfocitos T, tolerancia y patologías del sistema inmune (Keir et al, 2008). Un estudio reciente demostró que el IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos T CD4+ PD-1<sup>high</sup> juegan un papel clave en la progresión de la nefritis en un modelo murino de lupus (Kasagi et al, 2010). Dos grupos de investigadores demostraron en forma paralela que la expresión de PD-L1 en los tejidos es fundamental para la protección contra linfocitos T auto-reactivos (Ansari et al, 2003; Keir et al, 2006), sin embargo la sobre-expresión de esta proteína en tejidos inflamados no es capaz de ejercer su función reguladora (Ansari et al, 2003; Bertsias et al, 2009). En este trabajo demostramos que la expresión de PD-L1 y PD-L2 aumenta significativamente en cDC y pDC de bazo de ratones lúpicos en comparación con las DCs de ratones prelúpicos y controles.

Muchos estudios han demostrado que los receptores SLAM poseen un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune (Calpe et al, 2008; Cannons et al, 2011). Evidencias recientes indican que los miembros de esta familia de receptores y sus proteínas adaptadoras participan en la inducción o mantención de enfermedades autoinmunes (Chan et al, 2006). Estos incluyen estudios correlativos en la artritis reumatoide (Isomaki et al, 1997), la enfermedad inflamatoria intestinal (Abadia-Molina et al, 2006), así como evidencia más directa en la encefalomiелitis alérgica experimental (Valdez et al, 2004) y en el lupus eritematoso sistémico (Hron et al, 2004). En este trabajo, hemos demostrado que cDC y pDC que provienen del bazo de ratones lúpicos

presentan diferencias en el patrón de expresión de los receptores SLAM, principalmente en SLAM F1 y F3 en comparación con las DCs que provienen de ratones pre-lúpicos y controles. Un reporte previo, ha indicado que SLAM F1 participa en la sinapsis inmunológica, actuando como una molécula de co-estimulación (Howie et al, 2002). Por otra parte, se ha documentado que la activación de SLAM F1 en DC humanas induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Bleharski et al, 2001) y que macrófagos derivados de ratones deficientes en SLAM F1 muestran una marcada reducción en la secreción de IL-12, TNF y NO (Wang et al, 2004). Es importante destacar que, Krus et al. demostró que las DCs maduras sobre-expresan SLAM F1 comparado con DCs inmaduras (Kruse et al, 2001). Por lo tanto, el aumento de la expresión de este receptor observado en las cDC que provienen del bazo de ratones lúpicos podría explicarse por una acelerada maduración de estas células en ausencia de señales de peligro extrínsecos. Debido a que los receptores SLAM F1 interactúan de manera homotípica y que tanto DCs como linfocitos T y B aumentan la expresión de SLAM F1 en el curso de la enfermedad, proponemos que todas estas subpoblaciones celulares pueden producir interacciones de mayor avidéz y ser responsables del estado de hiperactivación que se produce en el lupus. Cuando analizamos el efecto *in vitro* de DCs provenientes de ratones lúpicos sobre la expresión de SLAM F1 y F6 en LT de ratones controles, sólo observamos una moderada inhibición en la expresión de SLAM F6 (Figura 15). Es probable que los cambios en la expresión de estos receptores sea una

característica propia de los linfocitos provenientes de ratones lúpicos y no una consecuencia directa de la interacción con DCs de ratones lúpicos.

Los linfocitos B son esenciales en la patogénesis del lupus debido a una combinación de mecanismos mediados por anticuerpos o independiente de ellos, los cuales incluyen la presentación de autoantígenos, polarización de linfocitos T, mantención de LT de memoria, inhibición de Treg, secreción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas, y la organización de tejido linfoide terciario, participando de esta manera en la generación y/o la amplificación de las respuestas autoinmunes (Sanz & Lee, 2010). Recientemente se ha documentado que se requiere de la señalización de SAP para la generación y mantención de la inmunidad humoral a largo plazo (Schwartzberg et al, 2009). En este estudio demostramos que, si bien el número absoluto de LB en el bazo de ratones lúpicos no cambia en comparación con ratones prelúpicos y control (datos no mostrados), los LB de ratones lúpicos sobre-expresan SLAM F1 y las moléculas adaptadoras SAP y EAT-2 (Figs. 7 y 8). En concordancia con estudios previos (Aldhamen et al, 2012), determinamos que la sobre-expresión de EAT-2 en LB de bazo de ratones lúpicos se correlaciona con la inducción de la molécula co-estimuladora CD86, contribuyendo a la activación de las células T (Fig. 6). Se ha descrito que SLAM F1 tiene diversas funciones, incluyendo la co-estimulación de linfocitos T y B y la regulación de la proliferación y diferenciación de las células B (Cannons et al, 2011). Por lo que la elevada expresión de SLAM F1 y sus proteínas adaptadoras en LB que

proviene de ratones lúpicos podría incrementar la proliferación de LB y la diferenciación hacia células plasmáticas.

Como consecuencia de la mayor expresión de moléculas de co-estimulación en las DCs lúpicas, se encontró que los linfocitos T CD4+ del mismo ratón presentan un estado de hiper-activación (Fig. 9 y 10). Se ha demostrado que en ciertas enfermedades autoinmunes los linfocitos T CD4+PD-1+ que producen IFN- $\gamma$  se acumulan en los sitios inflamados (Hatachi et al., 2003). Además, el IFN- $\gamma$  producido por estas células es responsable del cambio de clase de las IgG, la producción de IgG2a y los anti-ds-DNA en ratones BWF1 (Jacob et al, 1987; La Cava et al, 2004). En concordancia con estos antecedentes, nosotros demostramos que el porcentaje de linfocitos T CD4+PD-1+ en el bazo de ratones lúpicos fue significativamente mayor comparado con ratones prelúpicos y controles (Figura 9A y B). Al mismo tiempo, encontramos que los linfocitos T de ratones lúpicos producen significativamente más IFN- $\gamma$  e IL-10 que linfocitos T CD4+ que provienen de ratones prelúpicos y controles (Figura 9C). Estos resultados se corroboran con lo encontrado en experimentos de co-cultivos, donde observamos que las DCs que provienen de bazo de ratones lúpicos inducen un fenotipo TH1 en LT vírgenes (Figura 14). Confirmando que el fenotipo observado en los LT de ratones lúpicos es en parte, una consecuencia directa de la interacción con las DCs.

Una subpoblación de LT implicados en la aparición de síndromes autoinmunes son las células T reguladoras (Sakaguchi, 2000). Nuestros resultados revelaron un aumento del porcentaje de Treg en el bazo de ratones lúpicos (determinado por la

expresión intracelular de Foxp3) en comparación con ratones preláupicos y controles. Inesperadamente, los Treg de bazo de ratones lúpicos expresan marcadores de activación, a pesar de que exhiben una función supresora normal (Fig. 13). Cuando investigamos el fenotipo de los Tregs de ratones lúpicos descubrimos que una gran proporción de estas células son CD25 negativos. Estos resultados se confirman con estudios recientes que indican un aumento en la población de Treg CD25- en sangre de pacientes con LES (Bonelli et al, 2009; Zhang et al, 2008), sin embargo la importancia clínica de esta población se desconoce. Además, determinamos que los Treg de bazo de ratones lúpicos disminuyen significativamente la expresión de SLAM F1, sugiriendo que estas células podrían establecer interacciones de baja avidéz con LB y LT auto-reactivos contribuyendo de este modo al desarrollo de la enfermedad.

La adecuada localización de las DCs en los órganos linfoides y su reclutamiento hacia los sitios de la inflamación en respuesta a estímulos quimiotácticos, son críticos para una respuesta inmune efectiva (Randolph et al, 2008; Sallusto & Lanzavecchia, 2000). Un deterioro de la capacidad migratoria podría llevar a cambios relacionados con LES, como una alteración en el número de DCs, problemas de distribución, o defectos en la eliminación del material apoptótico o una disminución en la inducción de tolerancia hacia antígenos propios. En el presente estudio, demostramos que las DCs de ratones lúpicos y preláupicos tienen características distintivas que les permiten migrar y permanecer en el bazo más eficiente que las DCs de ratones controles (Fig. 16). La mayor frecuencia de DCs encontradas en el bazo de los ratones preláupicos y

lúpicos en comparación con el bazo de ratones de control sugiere que el microambiente del bazo de ratones lúpicos puede desempeñar un papel importante en la localización de las DCs.

Las quimioquinas dirigen la migración de los leucocitos a lo largo del cuerpo y organizan la respuesta inflamatoria. Se ha descrito, que la sobre-expresión de algunas quimioquinas puede generar un reclutamiento inadecuado de linfocitos auto-reactivos a los sitios de inflamación (Tang et al, 2008; Vielhauer et al, 2007). Alternativamente, la elevación sistémica de quimioquinas puede desensibilizar a los receptores de quimioquinas expresados en los leucocitos activados, lo que resulta en la pérdida de los mecanismos de homing normales y, en consecuencia se generan respuestas inflamatorias globales (Segerer et al, 2000).

Estudios previos en humanos han vinculado a las quimioquinas CCL2 (MCP-1) y CXCL10 (IP10) con la actividad del LES (Bauer et al, 2009; Fu et al, 2008; Vielhauer et al, 2007). En concordancia con estos trabajos, determinamos que las DCs de ratones lúpicos expresan mayores niveles génicos de CCL2, CCL8 (MCP2) y CXCL10 comparado con DCs de ratones prelúpicos y controles. CCL2 y CCL8 son quimioquinas inflamatorias que atraen a neutrófilos, monocitos y DCs inmaduras. Adicionalmente, CXCL10 participa en el reclutamiento de pDC, la principal fuente de IFN tipo I (Wenzel & Tuting, 2007). Esto se correlaciona con el aumento de IFN- $\alpha$  en el suero de pacientes con LES y con la actividad y gravedad de la enfermedad (Thibault & Utz, 2003). Por otra lado, estas quimioquinas pueden ser inducidas por IFN- $\alpha$ , ya que sus secuencias promotoras

poseen secuencias consenso para los elementos que responden a esta citoquina, incluyendo ISRE (IFN-estimulado elemento de respuesta) y el IRF (interferón factor regulador) (Fu et al, 2008). Adicionalmente, demostramos que sólo las DCs que provienen de bazo de ratones lúpicos reducen significativamente la expresión génica de los receptores de quimioquinas CCR2, CCR3, CCR4, CCR1, CCR9, CXCR7 y CCR1L1 en comparación con DCs que provienen de bazo de ratones prelúpicos y controles. Se ha documentado que las DCs maduras disminuyen la expresión de las quimioquinas inflamatorias y sus receptores respectivos, tales como CCR2-CCL2 (Geissmann et al, 2003; Merad et al, 2002), CCR5-CCL5 (Stumbles et al, 2001), y CCR6-CCL20 (Merad et al, 2002), sugiriendo que las DCs que provienen de bazo de ratones lúpicos pierden algunos receptores de quimioquinas debido a su estado de hiper-activación.

Estudios recientes han demostrado que la pDC tolerogénicas presentes en los tejidos linfoides expresan el receptor de quimioquina CCR9 (Hadeiba et al, 2008), un receptor involucrado en el homing de linfocitos T al intestino delgado (Kunkel et al, 2000) y en el homing de células progenitoras al timo (Uehara et al, 2002). Interesantemente, se ha demostrado que las pDC CCR9+ inducen eficazmente Treg, inhiben las respuestas inmunes específicas de injerto contra huésped (GVHD) y transportan antígenos periféricos al timo promoviendo la tolerancia central (Hadeiba et al, 2012). Por lo tanto, es posible que la DCs lúpicas que tienen una menor expresión de CCR9, sean intrínsecamente ineficientes para inducir tolerancia central. Importantemente, se demostró por citometría de flujo que las pDC que provienen de ratones lúpicos pierden

significativamente la expresión de CCR9 y CCR4, y que las cDC pierden la expresión de CCR9. El conjunto de estos resultados sugiere que la producción de quimioquinas en el microambiente del bazo y la pérdida de expresión de los receptores de quimioquinas en las DCs de bazo de ratones lúpicos permitiría una localización preferencial de DCs en ese órgano (Gleisner et al, 2013).

Se ha documentado que las células estromales pueden controlar la respuesta inmune a través de la regulación de la producción de quimioquinas (Mueller & Germain, 2009), sin embargo se desconoce el papel de estas células en la patogénesis del LES. Nuestros resultados indican que las células estromales de bazo de ratones lúpicos muestran diferencias significativas en la expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas en comparación con las células de ratones prelúpicos y controles (Gleisner et al, 2013). En concordancia con resultados de otros grupos de investigación (Bauer et al, 2009; Lynch et al, 2003; Wong et al, 2010), encontramos una mayor expresión de CXCL13, IL-16 y CXCL12 en células estromales de bazo de ratones lúpicos así como aumento de la expresión de CX3CL1 y CCL19. CCL19 es el ligando del receptor de CCR7 por lo tanto participa en la atracción de células CCR7+ hacia las zonas de LT en los órganos linfoides secundarios (Forster et al, 1999). CXCL12 o el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) es expresado por células de diferentes tejidos y participa en la migración de linfocitos, monocitos, DCs y precursores hematopoyéticos. Se ha documentado que pacientes lúpicos poseen un aumento de CXCL12 y se ha propuesto que esta quimioquina promueve la movilización de

precursores CD34+ al sitio de daño e inflamación como un mecanismo de reparación (Wang et al, 2009). En concordancia con los datos de la literatura, es probable que la acumulación de DCs lúpicas en el bazo sea una consecuencia de la atracción de precursores de DCs. Por otro lado, la IL-16 es una citoquina producida principalmente por LT CD8<sup>+</sup> e induce la quimiotaxis de LT CD4<sup>+</sup> y de monocitos. Adicionalmente, se ha descrito que el suero de pacientes lúpicos posee elevados niveles de esta citoquina, la cual se asocia con la severidad de la enfermedad (Lard et al, 2002). En conjunto estos resultados sugieren que las células estromales de bazo de ratones lúpicos participan en la acumulación de las DCs y en consecuencia, en una mayor activación de linfocitos T, aunque el mecanismo exacto aún no se ha dilucidado.

## **5.- RESUMEN DE RESULTADOS**

- Uno de los resultados notables durante el desarrollo del lupus es el aumento significativo de células dendríticas tanto convencionales como plasmacitoides en bazo y sangre. Por otra parte, estas células dendríticas muestran una mayor expresión de moléculas de coestimulación y de receptores SLAM comparado a ratones prelúpicos y controles.
- Los linfocitos B del bazo de ratones lúpicos poseen también un fenotipo activado, sobre-expresan SLAM F1 y las proteínas adaptadoras SAP y EAT-2 en comparación con LB que provienen de ratones prelúpicos y controles.
- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de bazo de ratones lúpicos poseen un fenotipo activado y producen mayores niveles de IFN- $\gamma$  e IL-10 que los linfocitos T

CD4+ de ratones prelúpicos y controles. En condiciones basales sobreexpresan SLAM F1 y SLAM F6.

- El bazo de ratones lúpicos presenta un aumento de una población anormal de LT reguladores de fenotipo CD4+Foxp3+CD25-. Los linfocitos Treg CD25+ poseen una actividad supresora normal. Extrañamente, ambas poblaciones de linfocitos Treg poseen marcadores de activación similar a linfocitos T efectores y una expresión disminuida de SLAM F1.
- Las DCs de ratones prelúpicos y lúpicos migran preferencialmente al bazo en comparación a DCs de ratones controles.
- Las DCs de ratones lúpicos poseen un patrón de expresión génica de quimioquinas y receptores de quimioquinas concordante con la acumulación de DCs en el bazo.
- El estroma del bazo de ratones lúpicos posee mayores niveles de quimioquinas con la capacidad de atraer precursores de DCs y linfocitos Th1 en comparación al estroma del bazo de ratones prelúpicos y controles.

## **CONCLUSIÓN**

En conjunto, nuestros resultados nos permiten proponer que las quimioquinas presentes en el microambiente del bazo de los ratones lúpicos podrían ser responsables del homing preferencial de las células dendríticas y de otras subpoblaciones celulares hacia el bazo. Esto genera una acumulación anormal de células dendríticas en este órgano y la consecuente activación de linfocitos T y B, mecanismo que conduce a la producción de una respuesta autoinmune. Un aumento de linfocitos T reguladores podría estar reflejando un mecanismo compensatorio, incapaz de controlar la autoinmunidad.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

Abadia-Molina AC, Ji H, Faubion WA, Julien A, Latchman Y, Yagita H, Sharpe A, Bhan AK, Terhorst C (2006) CD48 controls T-cell and antigen-presenting cell functions in experimental colitis. *Gastroenterology* **130**: 424-434

Aldhamen YA, Seregin SS, Schuldt NJ, Rastall DP, Liu CJ, Godbehere S, Amalfitano A (2012) Vaccines expressing the innate immune modulator EAT-2 elicit potent effector memory T lymphocyte responses despite pre-existing vaccine immunity. *J Immunol* **189**: 1349-1359

Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, Yamazaki T, Azuma M, Iwai H, Khoury SJ, Auchincloss H, Jr., Sayegh MH (2003) The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* **198**: 63-69

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811

Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252

Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL (2005) Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **202**: 1131-1139

Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, Panoskaltsis-Mortari A, Gregersen PK, Behrens TW, Baechler EC (2009) Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. *Arthritis Rheum* **60**: 3098-3107

Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, Ronnblom L (2000) Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* **9**: 664-671

Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, Raptopoulou A, Papadimitraki E, Goulielmos G, Kritikos H, Sidiropoulos P, Tzardi M, Kardassis D, Mamalaki C, Boumpas DT (2009) Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **60**: 207-218

Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG (2001) Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **60**: 523-526

Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J (2001) Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* **294**: 1540-1543

Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL (2001) Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* **167**: 3174-3181

Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C (2009) Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **182**: 1689-1695

Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C (2010) Treg and lupus. *Ann Rheum Dis* **69 Suppl 1**: i65-66

Busser BW, Adair BS, Erikson J, Laufer TM (2003) Activation of diverse repertoires of autoreactive T cells enhances the loss of anti-dsDNA B cell tolerance. *J Clin Invest* **112**: 1361-1371

Calpe S, Wang N, Romero X, Berger SB, Lanyi A, Engel P, Terhorst C (2008) The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* **97**: 177-250

Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL (2011) SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol* **29**: 665-705

Cannons JL, Yu LJ, Hill B, Mijares LA, Dombroski D, Nichols KE, Antonellis A, Koretzky GA, Gardner K, Schwartzberg PL (2004) SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity* **21**: 693-706

Carroll MC (2004) A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol* **4**: 825-831

Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A (1999) Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* **190**: 815-826

- Casciola-Rosen L, Rosen A (1997) Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus* **6**: 175-180
- Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* **179**: 1317-1330
- Cederblad B, Blomberg S, Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L (1998) Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha-producing cells. *J Autoimmun* **11**: 465-470
- Chan AY, Westcott JM, Mooney JM, Wakeland EK, Schatzle JD (2006) The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **18**: 656-664
- Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ (1999) A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* **189**: 1639-1648
- Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* **354**: 610-621
- Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH (2010) Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* **207**: 681-688
- Colonna L, Dinnall JA, Shivers DK, Frisoni L, Caricchio R, Gallucci S (2006) Abnormal costimulatory phenotype and function of dendritic cells before and after the onset of severe murine lupus. *Arthritis Res Ther* **8**: R49
- Crispin JC, Alcocer-Varela J (2007) The role myeloid dendritic cells play in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **6**: 450-456
- Crispin JC, Vargas-Rojas MI, Monsivais-Urenda A, Alcocer-Varela J (2012) Phenotype and function of dendritic cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* **143**: 45-50
- Dall'era MC, Cardarelli PM, Preston BT, Witte A, Davis JC, Jr. (2005) Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE. *Ann Rheum Dis* **64**: 1692-1697

Decker P, Kotter I, Klein R, Berner B, Rammensee HG (2006) Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* **45**: 1087-1095

Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK (1996) Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* **97**: 2063-2073

Ding D, Mehta H, McCune WJ, Kaplan MJ (2006) Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **177**: 5878-5889

Fairhurst AM, Wandstrat AE, Wakeland EK (2006) Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Adv Immunol* **92**: 1-69

Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL (2001) Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* **159**: 237-243

Ferrante P, Fusi ML, Saresella M, Caputo D, Biasin M, Trabattoni D, Salvaggio A, Clerici E, de Vries JE, Aversa G, Gazzullo CL, Clerici M (1998) Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expressing lymphocytes in acute multiple sclerosis. *J Immunol* **160**: 1514-1521

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**: 23-33

Fransen JH, van der Vlag J, Ruben J, Adema GJ, Berden JH, Hilbrands LB (2010) The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **12**: 207

Fu Q, Chen X, Cui H, Guo Y, Chen J, Shen N, Bao C (2008) Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* **10**: R112

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**: 71-82

Gerl V, Lischka A, Panne D, Grossmann P, Berthold R, Hoyer BF, Biesen R, Bruns A, Alexander T, Jacobi A, Dorner T, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F (2010) Blood

dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. *Ann Rheum Dis* **69**: 1370-1377

Gerli R, Nocentini G, Alunno A, Bocci EB, Bianchini R, Bistoni O, Riccardi C (2009) Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **8**: 426-430

Gill MA, Blanco P, Arce E, Pascual V, Banchereau J, Palucka AK (2002) Blood dendritic cells and DC-poietins in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* **63**: 1172-1180

Gilliet M, Cao W, Liu YJ (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **8**: 594-606

Gioud M, Kotzin BL, Rubin RL, Joslin FG, Tan EM (1983) In vivo and in vitro production of anti-histone antibodies in NZB/NZW mice. *J Immunol* **131**: 269-274

Gleisner MA, Reyes P, Alfaro J, Solanes P, Simon V, Crisostomo N, Sauma D, Roseblatt M, Bono MR (2013) Dendritic and stromal cells from the spleen of lupic mice present phenotypic and functional abnormalities. *Mol Immunol* **54**: 423-434

Grammer AC, Lipsky PE (2003) B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **5 Suppl 4**: S22-27

Gubbels MR, Jorgensen TN, Metzger TE, Menze K, Steele H, Flannery SA, Rozzo SJ, Kotzin BL (2005) Effects of MHC and gender on lupus-like autoimmunity in Nba2 congenic mice. *J Immunol* **175**: 6190-6196

Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, Nguyen L, Ghodsi A, Adler S, Butcher EC (2012) Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* **36**: 438-450

Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC (2008) CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* **9**: 1253-1260

Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, Wahl B, Kremmer E, Forster R, Pabst O (2008) Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med* **205**: 2483-2490

Hoffman RW (2004) T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* **113**: 4-13

Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL (1979) Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* **301**: 5-8

Horwitz DA (2010) Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE. *Arthritis Res Ther* **12**: 101

Howie D, Simarro M, Sayos J, Guirado M, Sancho J, Terhorst C (2002) Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood* **99**: 957-965

Hron JD, Caplan L, Gerth AJ, Schwartzberg PL, Peng SL (2004) SH2D1A regulates T-dependent humoral autoimmunity. *J Exp Med* **200**: 261-266

Ioannou Y, Isenberg DA (2000) Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum* **43**: 1431-1442

Ishikawa S, Nagai S, Sato T, Akadegawa K, Yoneyama H, Zhang YY, Onai N, Matsushima K (2002) Increased circulating CD11b+CD11c+ dendritic cells (DC) in aged BWF1 mice which can be matured by TNF-alpha into BLC/CXCL13-producing DC. *Eur J Immunol* **32**: 1881-1887

Isomaki P, Aversa G, Cocks BG, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, de Vries JE, Punnonen J (1997) Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J Immunol* **159**: 2986-2993

Jacob CO, van der Meide PH, McDevitt HO (1987) In vivo treatment of (NZB X NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J Exp Med* **166**: 798-803

Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, Dorner T (2003) Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **48**: 1332-1342

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**: 225-234

Jin O, Kavikondala S, Sun L, Fu R, Mok MY, Chan A, Yeung J, Lau CS (2008) Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient CD83 expression. *Lupus* **17**: 654-662

Jorgensen TN, Alfaro J, Enriquez HL, Jiang C, Loo WM, Atencio S, Bupp MR, Mailloux CM, Metzger T, Flannery S, Rozzo SJ, Kotzin BL, Roseblatt M, Bono MR, Erickson LD (2010) Development of murine lupus involves the combined genetic contribution of the SLAM and FcγR intervals within the Nba2 autoimmune susceptibility locus. *J Immunol* **184**: 775-786

Kalled SL, Cutler AH, Burkly LC (2001) Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti-CD154 treatment. *J Immunol* **167**: 1740-1747

Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, Kumagai S (2010) Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J Immunol* **184**: 2337-2347

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **26**: 677-704

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH (2006) Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* **203**: 883-895

Keszei M, Detre C, Rietdijk ST, Munoz P, Romero X, Berger SB, Calpe S, Liao G, Castro W, Julien A, Wu YY, Shin DM, Sancho J, Zubiaur M, Morse HC, 3rd, Morel L, Engel P, Wang N, Terhorst C (2011) A novel isoform of the Ly108 gene ameliorates murine lupus. *J Exp Med* **208**: 811-822

Kim JR, Mathew SO, Patel RK, Pertusi RM, Mathew PA (2010) Altered expression of signalling lymphocyte activation molecule (SLAM) family receptors CS1 (CD319) and 2B4 (CD244) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* **160**: 348-358

Kinoshita K, Tesch G, Schwarting A, Maron R, Sharpe AH, Kelley VR (2000) Costimulation by B7-1 and B7-2 is required for autoimmune disease in MRL-Faslpr mice. *J Immunol* **164**: 6046-6056

Koller M, Zwolfer B, Steiner G, Smolen JS, Scheinecker C (2004) Phenotypic and functional deficiencies of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Int Immunol* **16**: 1595-1604

Kruse M, Meinl E, Henning G, Kuhnt C, Berchtold S, Berger T, Schuler G, Steinkasserer A (2001) Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on

mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* **167**: 1989-1995

Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW (2000) Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* **192**: 761-768

La Cava A, Ebling FM, Hahn BH (2004) Ig-reactive CD4+CD25+ T cells from tolerized (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice suppress in vitro production of antibodies to DNA. *J Immunol* **173**: 3542-3548

Lard LR, Roep BO, Verburch CA, Zwinderman AH, Huizinga TW (2002) Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus* **11**: 181-185

Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK, Turley SJ (2007) Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* **8**: 181-190

Lin Q, Dong C, Cooper MD (1998) Impairment of T and B cell development by treatment with a type I interferon. *J Exp Med* **187**: 79-87

Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC (1998) Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* **101**: 1448-1457

Liu Z, Bethunaickan R, Huang W, Lodhi U, Solano I, Madaio MP, Davidson A (2011) Interferon-alpha accelerates murine systemic lupus erythematosus in a T cell-dependent manner. *Arthritis Rheum* **63**: 219-229

Lynch EA, Heijens CA, Horst NF, Center DM, Cruikshank WW (2003) Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J Immunol* **171**: 4965-4968

Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, Nasonov EL, Bykovskaia SN (2007) Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* **601**: 113-119

Marks SD, Tullus K (2012) Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol* **27**: 1855-1868

McCowan CB (1998) Systemic lupus erythematosus. *J Am Acad Nurse Pract* **10**: 225-231; quiz 232-224

Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG (2002) Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* **3**: 1135-1141

Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Kimura H, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K (2005) Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* **142**: 84-91

Molenaar R, Greuter M, van der Marel AP, Roozendaal R, Martin SF, Edele F, Huehn J, Forster R, O'Toole T, Jansen W, Eestermans IL, Kraal G, Mebius RE (2009) Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells. *J Immunol* **183**: 6395-6402

Monrad SU, Rea K, Thacker S, Kaplan MJ (2008) Myeloid dendritic cells display downregulation of C-type lectin receptors and aberrant lectin uptake in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **10**: R114

Moore C, Sauma D, Reyes PA, Morales J, Roseblatt M, Bono MR, Fierro JA (2010) Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) allogeneic T cells. *Transplant Proc* **42**: 371-375

Morel L, Yu Y, Blenman KR, Caldwell RA, Wakeland EK (1996) Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain. *Mamm Genome* **7**: 335-339

Moser B, Loetscher P (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* **2**: 123-128

Moss J, Shore I, Woodrow D, Gresser I (1988) Interferon-induced glomerular basement membrane and endothelial cell lesions in mice. An immunogold ultrastructural study of basement membrane components. *Am J Pathol* **133**: 557-563

Mueller SN, Germain RN (2009) Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**: 618-629

Muller-Eberhard HJ (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* **57**: 321-347

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**: 145-176

Nakajima A, Azuma M, Kodera S, Nuriya S, Terashi A, Abe M, Hirose S, Shirai T, Yagita H, Okumura K (1995) Preferential dependence of autoantibody production in murine lupus on CD86 costimulatory molecule. *Eur J Immunol* **25**: 3060-3069

Nichols KE, Ma CS, Cannons JL, Schwartzberg PL, Tangye SG (2005) Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* **203**: 180-199

Palucka AK, Banchereau J, Blanco P, Pascual V (2002) The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol* **80**: 484-488

Paust S, Cantor H (2005) Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* **204**: 195-207

Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlondorff D (2001) Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* **12**: 1369-1382

Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ (2000) Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* **76**: 227-324

Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G (2004) Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* **103**: 3058-3064

Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S (2008) Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* **26**: 293-316

Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V (2011) Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* **29**: 163-183

Rethi B, Gogolak P, Szatmari I, Veres A, Erdos E, Nagy L, Rajnavolgyi E, Terhorst C, Lanyi A (2006) SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **107**: 2821-2829

- Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV (2003) Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity* **36**: 463-472
- Rozzo SJ, Vyse TJ, Drake CG, Kotzin BL (1996) Effect of genetic background on the contribution of New Zealand black loci to autoimmune lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15164-15168
- Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**: 455-458
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**: 8-27
- Sallusto F, Lanzavecchia A (2000) Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* **177**: 134-140
- Sanz I, Lee FE (2010) B cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* **6**: 326-337
- Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL (2009) SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* **9**: 39-46
- Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D (2000) Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiology and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* **11**: 152-176
- Shlomchik MJ, Madaio MP, Ni D, Trounstein M, Huszar D (1994) The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *J Exp Med* **180**: 1295-1306
- Siegert CE, Breedveld FC, Daha MR (1993) Autoantibodies against C1q in systemic lupus erythematosus. *Behring Inst Mitt*: 279-286
- Steinman RM, Idoyaga J (2010) Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev* **234**: 5-17
- Stumbles PA, Strickland DH, Pimm CL, Proksch SF, Marsh AM, McWilliam AS, Bosco A, Tobagus I, Thomas JA, Napoli S, Proudfoot AE, Wells TN, Holt PG (2001) Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J Immunol* **167**: 228-234

Sun LY, Zhang HY, Feng XB, Hou YY, Lu LW, Fan LM (2007) Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **16**: 121-128

Tan EM (2012) Autoantibodies, autoimmune disease, and the birth of immune diagnostics. *J Clin Invest* **122**: 3835-3836

Tang J, Gu Y, Zhang M, Ye S, Chen X, Guo Q, Qian J, Bao C, Chen S, Shen N (2008) Increased expression of the type I interferon-inducible gene, lymphocyte antigen 6 complex locus E, in peripheral blood cells is predictive of lupus activity in a large cohort of Chinese lupus patients. *Lupus* **17**: 805-813

Theil D, Farina C, Meinel E (2005) Differential expression of CD150 (SLAM) on monocytes and macrophages in chronic inflammatory contexts: abundant in Crohn's disease, but not in multiple sclerosis. *J Clin Pathol* **58**: 110-111

Thibault DL, Utz PJ (2003) Interpreting interest in interferon-alpha. *Arthritis Res Ther* **5**: 246-248

Uehara S, Grinberg A, Farber JM, Love PE (2002) A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* **168**: 2811-2819

Valdez PA, Wang H, Seshasayee D, van Lookeren Campagne M, Gurney A, Lee WP, Grewal IS (2004) NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J Biol Chem* **279**: 18662-18669

Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE (2007) Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **178**: 2579-2588

Vargas-Rojas MI, Crispin JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J (2008) Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* **17**: 289-294

Veillette A (2006) Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* **6**: 56-66

Veillette A, Cruz-Munoz ME, Zhong MC (2006) SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol* **27**: 228-234

Vielhauer V, Anders HJ, Schlondorff D (2007) Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in lupus nephritis. *Semin Nephrol* **27**: 81-97

- Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW (2001) Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* **15**: 397-408
- Wan S, Xia C, Morel L (2007) IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4+CD25+ T cell regulatory functions. *J Immunol* **178**: 271-279
- Wandstrat AE, Nguyen C, Limaye N, Chan AY, Subramanian S, Tian XH, Yim YS, Pertsemelidis A, Garner HR, Jr., Morel L, Wakeland EK (2004) Association of extensive polymorphisms in the SLAM/CD2 gene cluster with murine lupus. *Immunity* **21**: 769-780
- Wang A, Fairhurst AM, Tus K, Subramanian S, Liu Y, Lin F, Igarashi P, Zhou XJ, Batteux F, Wong D, Wakeland EK, Mohan C (2009) CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus. *J Immunol* **182**: 4448-4458
- Wang N, Satoskar A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH, Terhorst C (2004) The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* **199**: 1255-1264
- Wenzel J, Tuting T (2007) Identification of type I interferon-associated inflammation in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus opens up options for novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol* **16**: 454-463
- Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP, Lam CW (2010) Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J Clin Immunol* **30**: 45-52
- Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG (1998) Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* **161**: 1313-1319
- Xu L, Zhang L, Yi Y, Kang HK, Datta SK (2004) Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* **10**: 411-415
- Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y, Lipsky PE (2008) Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **67**: 1037-1040
- Zhu J, Liu X, Xie C, Yan M, Yu Y, Sobel ES, Wakeland EK, Mohan C (2005) T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells. *J Clin Invest* **115**: 1869-1878