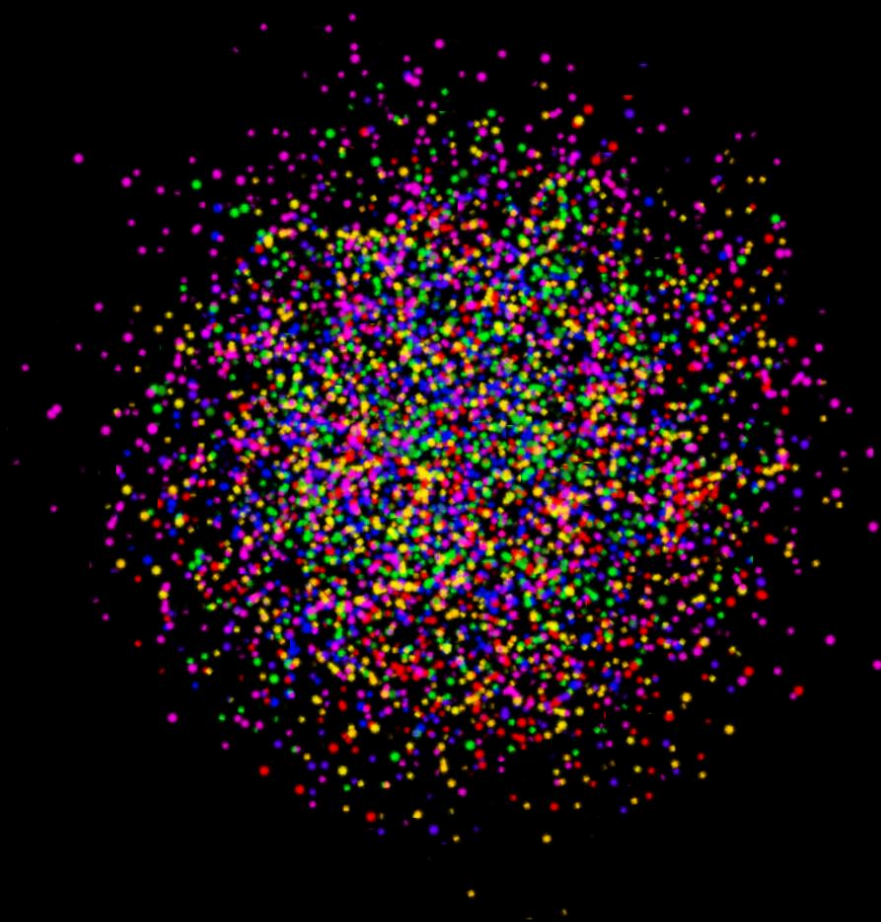


IMPACTO DE GALECTINA-3

en la formación espontánea de
Centros Germinales



CRISTIAN GABRIEL BECCARIA

2018



Universidad
Nacional
de Córdoba



REFORMA
1918-2018



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas

Impacto de Galectina-3

en la formación espontánea de

Centros Germinales

Cristian Gabriel Beccaria

IMPACTO DE GALECTINA-3

EN LA FORMACIÓN ESPONTÁNEA DE
CENTROS GERMINALES



TESIS DOCTORAL

para aspirar al título de
Doctor en Ciencias Químicas por la
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

por

Cristian Gabriel Beccaria

Nacido el 6 de Septiembre de 1988
en Balnearia, Córdoba, Argentina.

Directora

Adriana Gruppi

Investigadora Superiora, CONICET

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)

Profesora Titular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Comisión Asesora de Tesis

María Cecilia Rodríguez Galán

Investigadora Independiente, CONICET

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)

Profesora Adjunta, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Cristina Alicia Maldonado

Investigadora Principal, CONICET

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)

Profesora Adjunta, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

Mario Eduardo Guido

Investigador Principal, CONICET

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)

Profesor Titular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Evaluadora Externa

Eloísa Irene Arana

Investigadora Adjunta, CONICET

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)

Profesora Asistente, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires



Esta tesis doctoral fue desarrollada en el
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI)

y fue posible
gracias al apoyo financiero de



*A mi hermana Chili,
a la cual amo incondicionalmente.*

*A mi mamá y mi papá,
quienes me enseñaron la bondad del mundo y nunca dejaron de creer en mí.*

*A laiki,
que tantas veces me salvó la vida*

*A mis abuelas,
fuente del amor más puro del planeta.*

*A mis amigos del corazón,
quienes me acompañan en cada paso y respiro.*

*Y a todas las personas del planeta que luchan sin descanso,
a pesar de ser objeto de tantas
injusticias, privaciones y tormentos,
por un mundo más libre, justo y diverso para todxs.*



Prefacio

- ¡Cris! ¡Mirá esto! ¡Es increíble! ¡Parece una bola de fuego!

Estaba en mi segundo mes en la sección de oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas en el 2012, cuando escucho a Ceci llamarme desde el microscopio al encontrar una célula plasmática en el extendido de sangre de un paciente. En el centro del campo de visión, se encontraba una célula completamente nueva para mis ojos. Era un auténtico meteorito morado, completamente polarizado, con un núcleo inmenso y un halo perinuclear que nunca había visto en ninguna célula. Era una verdadera máquina productora de anticuerpos, cargada de vacuolas, completamente descontrolada. Ese día me di cuenta de que quería convertirme en inmunólogo. A los pocos meses, en una entrevista hermosa en el comedor del CIBICI, Adri Gruppi me contaba sobre sus ganas de desarrollar un proyecto que tenía pendiente hacía tiempo: ¿por qué la ausencia de Galectina-3 provocaba tantos disturbios en los linfocitos B y en las células plasmáticas? No tuve que pensarlo dos veces.

El trabajo presentado en esta tesis doctoral se focaliza en los eventos celulares y moleculares que ocurren en ausencia de una lectina, Galectina-3, que conducen a la diferenciación espontánea de linfocitos B vírgenes en linfocitos B de centro germinal y posteriormente en célula plasmática productora de anticuerpos. A su vez, esta tesis pone de manifiesto la importancia de Galectina-3 en el control de la tolerancia inmunológica y en cómo su deficiencia provoca inmensas cantidades de un mediador inflamatorio involucrado en la aparición de autorreactividad: IFN- γ .

En 1884, Walter Flemming describió sitios histológicamente definidos, dentro de folículos de órganos linfáticos secundarios, donde un gran número de células experimentan mitosis. Flemming llamó a estos sitios "Centros Germinales", pensando (erróneamente) que todas las células del cuerpo se generaban allí. Aunque esa premisa de Flemming ya fue refutada, el nombre de estos sitios se mantuvo. Actualmente se acepta que los centros germinales se forman en diferentes respuestas inmunitarias y son los sitios por excelencia de expansión clonal de linfocitos B en respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T. En un centro germinal, los linfocitos B se someten a procesos de recombinación y mutación del ADN y diferenciación, los cuales provocan la generación de células secretantes de anticuerpos de alta afinidad y linfocitos B de memoria de larga vida, asegurando una respuesta humoral a largo plazo.

El advenimiento de técnicas de avanzada permiten en la actualidad el estudio de los centros germinales con un altísimo grado de sofisticación. Esto habilita a que algunos de los descubrimientos iniciales se solidifiquen, y otros vuelvan a reanalizarse y replantearse. Incluso muchos de los grandes cánones del conocimiento sobre el sistema inmune fueron reconsiderados a través del estudio de los centros germinales.

En la última década, los aportes desde la inmunología protagonizaron una verdadera revolución en el tratamiento de muchísimas patologías y en la prevención de otras, y generaron esperanzas firmes de nuevas terapias para patologías que aún no logran tratarse eficazmente. En este sentido, esta tesis significó también para mí descubrir lo fascinante y complejo que es el sistema inmune y en el poder del conocimiento como herramienta transformadora de la vida y la salud de las personas.

Feliz lectura!

Cristian Beccaria

Tabla de Contenidos

Agradecimientos	15
Abreviaturas	19
Resumen	23
<i>Summary</i>	25
Introducción	27
1. Respuesta inmune mediada por linfocitos B	
1.1. Visión general de la respuesta inmune humoral dependiente de Centros Germinales.	30
1.2. Anatomía funcional de los Centros Germinales.	32
1.3. Linfocitos T cooperadores foliculares.	37
1.4. Evolución espacio-temporal de los Centros Germinales.	38
1.5. Destinos B post Centro Germinal: Células Plasmáticas y Células B de memoria.	41
1.6. Centros Germinales de larga vida y crónicos.	41
2. Tolerancia B y autoinmunidad.	
2.1. Centros Germinales espontáneos y autoinmunidad.	44
2.2. Factores que contribuyen a la formación espontánea de Centros Germinales.	45
3. Galectinas como proteínas moduladoras de procesos inmunológicos.	
3.1. Rol de Galectina-3 en el Sistema Inmune.	50
Antecedentes, Hipótesis y Objetivos	53
Resultados	
1. Gal-3 regula la diferenciación in-vitro de LiB.	57
2. Gal-3 juega un papel crítico en la formación de Centros Germinales.	59
3. Los LiB de ratones Gal-3 KO evidencian un perfil transcripcional y fenotípico	

asociado a la reacción de CG.	67
4. La ausencia de Gal-3 en los LiB es suficiente para desencadenar la generación espontánea de CGs.	69
5. Gal-3 regula la producción de IFN γ .	75
6. La ausencia de Gal-3 favorece la aparición de procesos autoinmunes tipo lupus.	82
7. El bloqueo de IFN γ previene la generación espontánea de CG y la consiguiente autoinmunidad.	91
8. La microflora intestinal no está involucrada en la inducción de CGs en los ratones Gal-3 KO.	96
9. La administración de Gal-3 exógena no reprime la generación de CGs espontáneos.	99
Discusión	105
Observaciones Finales y Perspectivas a Futuro	115
<i>Highlights</i>	119
Materiales y Métodos	123
Glosario	141
Bibliografía	145
Producción Científica	167

Agradecimientos

En enero del 2007 subía por primera vez la lomada al sur, en Ciudad Universitaria, en la que desemboca la calle Independencia. No podía contener la excitación de estar viviendo finalmente en la ciudad capital de mi provincia. No podía contener tampoco la adrenalina de ser parte de la Universidad, ese espacio que se parecía a la NASA desde mi inocente visión de aquel entonces. La Facu de Ciencias Químicas se convirtió, de a poco, en mi hogar. En pocos meses ya conocía de memoria cada uno de los perros que dormía en las baterías B, las grietas del camino, la ubicación de los jacarandás, los espacios verdes, las estatuas de los filósofos, los silencios de la biblioteca, las aulas lindas. Esos espacios, tan llenos de tierra y profunda felicidad, fueron una especie de molde que albergaría a la persona que siempre había querido ser. Simplemente no puedo imaginar mi vida sin haber pasado por la UNC. Mi mayor respeto y mis más profundos agradecimientos a la UNC y a la FCQ por esta suprema y preciosa libertad regalada, por invitarme a reflexionar sobre cada acción en la vida, por enseñarme a cuestionar cada dogma, por educarme en la visión de un mundo más justo, pluralista, libre y desprejuiciado, por mostrarme la incomparable belleza de la diversidad de la naturaleza, los humanos, las culturas y sociedades, por empujarme a abismos de los que nunca pensé podría salir ileso. Estos 12 años con vos fue una etapa de absoluto placer y felicidad. Gracias a mi querida Argentina, hogar de tantas pasiones, solidaridades, amores, contradicciones, ímpetus y odios. Me duele profundamente verte tan golpeada y en insesantes crisis. Gracias por brindarme la posibilidad de concretar el derecho fundamental a recibir educación. Siempre lucharé para que los gobiernos garanticen educación pública, gratuita, inclusiva, laica y de calidad, ingrediente fundamental para el crecimiento y equidad de los pueblos.

Venirme a la ciudad implicaba también un inmenso esfuerzo para toda mi familia, esfuerzos económicos y emocionales. Crecí en una familia que me inundó de amor desde el primer día y que nunca, absolutamente nunca, dejó de confiar en mí y en mis ideales. Gracias Ma por acompañarme desde bebé en cada paso, por tanto tiempo depositado en mí, por no descansar un solo segundo para que nunca me faltase nada, por las horas frente al piano, por ser mi amiga y compañera, por tantos abrazos. Gracias Pa por mostrarme la bondad de las personas, por las largas horas de charlas reflexivas, por tu amor por el cine y la lectura, por enseñarme a ser una persona humilde, noble y solidaria. A ambos dos, gracias por, sobre todo, quererme inconmensurablemente aun siendo quizás alguien muy alejado de lo que pensaban o deseaban que sería. Gracias por apoyar mis proyectos y dejarme construir mi propia versión. Gracias Chili de mi corazón, compañera de vida, hermana, amiga, madre, hija, confidente. Desde chiquitos siempre caminando juntos por la vida, ayudándonos a crecer el uno al otro, peleándonos y amándonos cada día. Tu presencia siempre fue un refugio y un hogar para mí. Cada golpe que recibimos en la vida siempre fue amortiguado por el otro. Sos la persona con la que pasé más horas en mi vida. Con vos encuentro la belleza minúscula en cada rincón de la tierra, disfrutamos esos pequeños grandes momentos. Todas las pelis, mates, charlas, silencios, compañías, tardes bajo el sol perdurarán para siempre en mí. Gracias laiki, negra hermosa efusiva, babosa y tierna por esos fundamentales quince años de puro amor. Fuiste para mí cada día el combustible infalible. Quien no te conoce, no sabe absolutamente nada mí. Por la única razón por la que quiero creer que existen otras vidas es para volverte a abrazar y no soltarte más. Gracias abue Iris por el inmenso amor que me diste, por cuidarme, educarme, protegerme y mimarme. Se que a nadie en el mundo le gustaría más escuchar y leer esta tesis que a vos, siempre fuiste la científica de la familia. Gracias por escuchar con atención suprema cada momento de mi carrera científica, por no parar de preguntarme cosas, por guardar mis dibujitos aun cuando fuesen hechos sobre servilletas de papel. Gracias abue Elba por tu cálido amor y compañerismo, por tu sensibilidad y cariño hacia mí siempre, por enseñarme a cocinar, por la energía contagiosa que siempre tenés, por mostrarme que el paso de los años y los cambios de generaciones son olas que tenemos

que surfear y no evitar, por enseñarme a ser una persona abierta. Gracias madrina por tu amor de madre, tu apoyo incondicional. Gracias Có de mi corazón, familia por adopción. Tantos años juntos compartiendo la vida tan intensamente. Gracias por ser un hogar para mí, por tus abrazos y besos sin comparación en el mundo, por tu mirada dulce y tierna, por tu arte, por la bondad de tus acciones. Gracias por acompañarme, fortalecerme e incentivar a descubrir el mundo. Te amo con locura.

Mi llegada al CIBICI fue en un momento de mi vida muy intenso. Acababa de volver de vivir la mejor experiencia de mi vida en Madrid y me encontraba absolutamente perdido en todas partes. Después de tener Inmunología Aplicada, una tarde de mayo le escribí a Eva con intenciones de incorporarme a su grupo. Eva me dijo que ya se había comprometido con otra persona, pero que quería que conversase con Adri Gruppi. Y así fue como llegué a vos, querida Adri. Estos seis años juntos fueron completamente maravillosos. A veces pienso en el pasado y me da vértigo pensar en una elección distinta de vos. Quiero agradecer desde lo más profundo de mi corazón todo lo que depositaste en mí para que llegase a ser hoy un *B-ólogo* extremadamente curioso, apasionado, desbordado y loco por la inmunología. Disfruté cada minuto de discusión científica con vos, cada paper trasgresor, cada desafío intelectual y técnico. Siempre me diste la libertad plena de pensar y hacer cualquier experimento que quisiese y donde quisiese. Me incentivaste y apoyaste en cada viaje científico, en cada experiencia internacional. Me empujaste a nuevos desafíos, me enseñaste a tener pensamiento crítico y me brindaste cientos de oportunidades de crecimiento profesional. Y todo este tiempo no sólo fuiste mi mentora científica, sino que fuiste una madre a tiempo completo, 24hs cualquier día de la semana. Estuviste acompañándome en los peores momentos, en mis desequilibrios amorosos, en mis pérdidas, en mi economía, en situaciones familiares... estuviste en cada gripe y en cada faringitis, siempre cuidándome con bondad sincera. Siempre me trataste como un par y sos también quien más me hizo sentir seguro de mí mismo en toda mi vida. Siempre serás EL ejemplo de científicx y de mentxr para mí y estoy orgulloso de que mi carrera científica este engendrada con tu impronta. Voy a estar eternamente agradecido. Gracias a Eva y Caro, otras de las madres de mi querido y amado GruMA. Compartimos muchos, muchos momentos bellísimos. Gracias por el amor hacia nosotros, por cuidarnos, aconsejarnos, escucharnos, consolarnos, entendernos, retornos. Aprendí muchísimo de ustedes dos y me llena de placer mirarlas sintiéndolas familia, amigas y colegas. Las tres juntas construyeron un hogar científico bellísimo. Nos inspiran a diario no solo en la pasión científica sino también en el rol que tenemos como sujetos sociales.

Gracias a mi amado Lab103, cuna de pasiones y multitudes. Aún me deja perplejo pensar que existe un lugar de trabajo tan hermoso como nuestro 103, donde todxs nos amamos con locura, donde todxs nos apoyamos con la fuerza de un mastodonte, donde todxs nos ayudamos, cuidamos, protegemos y mimamos. A todxs, tienen la responsabilidad de que este espíritu se mantenga. Gracias Facu por ser el mejor colega y compañero de doctorado que pudiese haber tenido, por ser incondicional, solidario, crítico, justo. Fuimos un dúo científico imbatible y crecí muchísimo al lado tuyo. Trabajar con vos en cada experimento fue un completo placer. Compartimos en poco tiempo (o no tan poco, en verdad) experiencias de vida muy intensas que hicieron que me preguntase sobre aspectos fundamentales en mi vida; siempre voy a estar agradecido con vos por todo eso. Llevaré siempre en mi cuerpo el abrazo que nos dimos el día que nos informaron sobre nuestras becas CONICET. Gracias a Sabri, Yami, Coti, Santi, Lauris y Nati, pipis de mi corazón, por estos meses y años de tanto cariño, lxs amo con locura. El solo hecho de imaginar mis días sin ustedes me parece insoportable. Gracias por escuchar cada una de mis incongruencias, por aconsejarme minuto a minuto, por compartir tantos vinos, mates, bailes, luces, cenas, canciones, autos, viajes, soles y mares. Fueron esenciales en esta etapa de mi vida, sus abrazos son lo más parecido a hacer una planchita sobre el mar. Gracias a mis queridas Ceci y Jime por acompañarme con tanto amor en mis primeros pasos, por la paciencia, ternura, dedicación y esmero. Gracias por toda la inspiración docente y por seguir estando a mi lado tan cerquita, aun estando cada una en un nuevo horizonte. Gracias Carito Am. por los momentos tan divertidos juntos de experimentos y por tus consejos científicos. Gracias Danny, Fer y Cinti por tantos momentos hermosos compartidos todos estos años, tantas pelis, música, viajes, birras y fiestas. Gracias Lu

y Colo, hermosxs del 103. Gracias por traernos a los mellis a nuestras vidas, gracias por tantos momentos de felicidad compartida, tantos mates, tanta energía positiva, tanta pila, tanta inspiración. Gracias Eli por llevarme al CIBICI y por los años lindos que compartimos. Gracias Melis por hacerme pensar siempre las cosas con un nuevo punto de vista. Gracias Xime, Lili, Carito Ab, Fer S y Nico P por sus sonrisas diarias, por todos los favores, charlas y momentos hermosos juntos. Gracias Yami, Flaquito, David, Agus y Belu por los abrazos y sonrisas diarias.

Gracias a mis compañeros y amigos de otros laboratorios, en especial a Emi, Claudio, Flor, Javi, Pau y Rachel. Con cada uno compartí momentos muy especiales y disfruté cada juntada, discusión y birra. Tengo los mejores momentos guardados con cada uno de ustedes.

Quiero agradecerle también al Depto. de Bioquímica Clínica de la FCQ, así como también al CIBICI, mis espacios de trabajo. Sé el inmenso esfuerzo que requiere mantener instituciones colosales como las nuestras, con tantos equipamientos, servicios e instalaciones sumamente costosas. Realmente requiere una habilidad extraordinaria en la gestión de recursos para poder mantener todo en excelentes condiciones y más aún en momentos políticos en los que los gobiernos de turno deciden recortar abrupta y descaradamente los recursos, como lo hace actualmente Cambiemos. En el CIBICI conocí a personas maravillosas, dentro y fuera de mi laboratorio. Gracias Dra. Riera porque siempre fue para mí un ejemplo de constante superación personal, por mostrarme cómo el trabajo, las instituciones y las sociedades científicas pueden ser atravesadas con absoluto compromiso, pasión y dedicación y ser placentero. Quiero agradecerle especialmente a Cris Motrán, amiga y colega a la que respeto muchísimo. Fue un placer compartir tantas charlas en el box y en los pasillos. Gracias Lau C, Cinthi, Rubén, Belkys y Silvia por toda la confianza depositada en mí en cada instancia, por las discusiones científicas y los debates sobre diversos temas de la vida. Gracias a los profes a cargo de las materias de inmunología que me convocaron para formar parte del plantel docente. Gracias especiales a Adri, Eva, Caro, Fabio, Vicky y Pilar por darme absoluta libertad para llevar a cabo la hermosa tarea de enseñar. Gracias por aceptar mis sugerencias y por pensar conmigo nuevas estrategias de enseñanza y llevarlas a cabo. Gracias Cris Ac por tu hermosa amistad, por tus consejos, por las preciosas horas que compartimos en las aulas y por todo lo que me enseñaste. Gracias a mi amada y querida Adri Secre, amiga entrañable, dulce, tierna, sumamente eficiente... siempre me solucionaste todos los problemas e inconvenientes en un segundo. Gracias Ceci Berta de mi corazón por organizar nuestro Lab y recursos tan eficientemente y por hacerlo siempre con una sonrisa. Gracias querida Colo, amiga e inspiración de vida, por tantas charlas profundas, por las reflexiones sobre la vida, las personas y las sociedades, por tus abrazos, palabras y gestos sinceros. Gracias a todo el personal de Bioterio, Citometría de Flujo, Microscopía y Cultivo Celular, quienes con su trabajo permiten que llevemos a cabo cada uno de nuestros experimentos. Quiero agradecerle especialmente a vos Vicky, preciosa e inspiradora amiga por todas las charlas hermosas sobre tantas cuestiones, tu arte, tu visión de la vida y tu compromiso en el trabajo. También quiero agradecer a Carlitos Mas y Pilar Crespo, con los que aprendí muchísimo y siempre se mostraron absolutamente predisuestos conmigo.

El doctorado es una instancia hermosa y de igual modo extremadamente demandante e intensa. Exige muchas horas de dedicación y también es un desafío emocional ya que hay que hacerle frente a muchas decepciones, angustias y estrés. El apoyo incondicional de mis amigos del mundo fue fundamental para vivir todos estos años con una actitud crítica, positiva, constructiva y creativa. Gracias desde lo más profundo de mi corazón a vos Glau, amor de amores, inspiración de vida. Con vos descubrí quién era. Gracias por tu bondad sin límites, tu amor, tu contención, tus besos y abrazos. Siempre serás para mí una persona fundamental en mi vida. Gracias especiales a Pame Bocco, Dai, Capu, Pame Barone y Javi, amigos con los que viví de las experiencias más intensas de mi vida. Gracias por incentivar-me a crecer y estar conmigo siempre. Gracias Mati R y Gabi R por todos los momentos hermosos juntos. Gracias a mis amigos de la facu, los que crecieron conmigo a la par durante mis primeros años universitarios: gracias eternas a Lu, Patrick, Meli, Enri y Jorgito, tengo recuerdos bellísimos de todas las vivencias juntos, los quiero

enormemente. Gracias Lisa, Fer Thom, Marcan, River, Memé, Cami y Lau Alv por cuánto me inspiran y por todas las experiencias trascendentales que vivimos juntos. Gracias Vero por tu amor a largo de tantos años. Gracias Luk, Mark, Coni, Gabrieu, Amalia, Trini, Petite, André, Manu, Chico, Ciarán, Domi y Pedrito porque conocerlos me convirtió en una persona más abierta y sensible; siempre es un placer saber que algún viaje nos está por encontrar. Gracias Mati por tu cine y arte. Gracias a Alicia por tu presencia constante. Gracias Fran por las preciosas charlas, por tus lecciones de italiano, por tu literatura y militancia. Gracias Pía por estos últimos años de presencia absoluta, cariño y amistad. Gracias a mi querido taller de literatura, a Majo, Lau, Tere, María, Diego y Marquitos, que me escucharon y descubrieron mi interior sin prejuicios. Gracias a mis queridos vecinos Fano y Santi que en poco tiempo se convirtieron en amigos cercanos y con los que compartí todas las semanas de estos últimos dos años.

Por último, gracias Glau, Nacho, Patito, Manu y Charly por todos los momentos de intenso y fugaz amor. Gracias por permitirme entender que el amor no tiene etiquetas, ni géneros, ni razas ni prejuicios. Gracias por mostrarme que el amor es algo hermoso y, sobre todo, sano.

Gracias a todas las personas que construyen un mundo mejor, a los que salen a la calle a reclamar derechos, a los que sin descanso persiguen sus sueños, a los que luchan por construir una sociedad más justa e igualitaria, a los que lloran felicidad, a los que viven la vida intensamente, a los que se enamoran mucho y rápido, a los artistas que modifican nuestra vida a cada instante, nos interpelan sobre nuestra existencia y nos liberan de los condicionamientos socioculturales.

La satisfacción más grande de mi vida es saber que estoy rodeado de las personas más hermosas de la tierra.

Gracias, gracias, gracias.

Cris.

Abreviaturas y Acrónimos

Abs	Antibióticos
Ac(s)	Anticuerpo(s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag(s)	Antígeno(s)
AID	Deaminasa de Citosina Inducida por Activación (del inglés: Activation Induced Cytosine Deaminase)
ANA	Anticuerpos anti-nucleares (del inglés: Anti-Nuclear Antibodies)
ANOVA	Análisis de la varianza
anti-dsDNA	Anticuerpos anti-ADN doble cadena (del inglés: anti-double stranded DNA antibodies)
anti-SM/RNP	Anticuerpos anti-ribonucleoproteínas nucleares de pequeño tamaño (de inglés: anti-Small nuclear Ribonucleoprotein antibodies)
ARN	Ácido Ribonucleico
ASC	Células secretantes de anticuerpos (del inglés: Antibody-Secreting Cells)
Baff	Factor activador de célula B (del inglés: B-Cell Activatig Factor)
Bcl-6	(del inglés: B-cell lymphoma 6)
BCR	Receptor del linfocito B (del inglés: B Cell Receptor)
B _{DZ}	Linfocito B de zona oscura
Blimp-1	(del inglés: B-lymphocyte induced maturation protein-1)
B _{LZ}	Linfocito B de zona clara
Bmem	Linfocito B de memoria
bNAbs	Anticuerpos altamente neutralizantes (del inglés: Broadly Neutralizing Antibodies)
CCR-	Receptor de quemoquina tipo beta (del inglés: beta Chemokine Receptor)
CXCR-	Receptor de quemoquina tipo alfa (del inglés: alpha Chemokine Receptor)
CD	(del inglés: Cluster of Differentiation)
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (del inglés: Centers for Disease Control and Prevention)
CDR	Dominio de reconocimiento de carbohidratos (del inglés: Carbohydrate Recognition Domain)
CG	Centro Germinal

CP	Célula Plasmática
csBmem	Linfocito B de memoria con cambio de isotipo de Igs
CSR	Switch de isotipo (del inglés: Class-Switch Recombination)
CTLA4	(del inglés: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
DC	Célula Dendrítica (del inglés: Dendritic Cell)
DZ	Zona oscura del centro germinal (del inglés: Dark Zone)
Ebi2	(del inglés: Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ELISpot	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos (del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay)
FAS	(del inglés: First Apoptosis Signal receptor; CD95)
FDC	Células dendríticas foliculares (del inglés: Follicular Dendritic Cells)
FMI	Intensidad de Fluorescencia Media (del inglés: Mean Fluorescence Intensity)
FMO	Control de fluorescencia (del inglés: Fluorescence Minus One)
Gal-	Galectina
h	hora/s
HEp-2	(del inglés: Human Epidermoid carcinoma strain #2)
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana (del inglés: Human Immunodeficiency Virus)
ICOS	(del inglés: Inducible T-cell COStimulator)
IFM	Intensidad de Fluorescencia Media
IFN- γ	Interferón gama (del inglés: Interferon-gamma)
IFN- γ R	Receptor de Interferón gama (del inglés: Interferon-gamma Receptor)
Ig(s)	Inmunoglobulina(s)
IL-	Interleukina
KO	Deficiente genéticamente (del inglés Knock-Out)
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
Li	Linfocito/s
LN	Ganglio Linfático (del inglés: lymph node)
LLPC	Célula Plasmática de larga vida (del inglés: Long-Lived Plasma Cell)
LPS	Lipopolisacárido
LZ	Zona clara del centro germinal (del inglés: Light Zone)

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: Major Histocompatibility Complex)
miR	MicroARN
MO	Médula Ósea
MyD88	(del inglés, Myeloid Differentiation primary response 88)
NK	Células Asesinas Naturales (del inglés: Natural Killers)
NKT	Células T Asesinas Naturales (del inglés: Natural Killers T cells)
PALS	Vaina linfoide periarteriolar (del inglés: PeriArteriolar Lymphoid Sheaths)
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés: Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)
PD-1	(del inglés: Programmed Cell Death-1)
PMA	(del inglés: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)
PNA	(del inglés: Peanut Agglutinin)
PP	Placas de Peyer
SAP	(del inglés: SLAM-associated protein)
SF	Solución Fisiológica
SHM	Hipermutación Somática (del inglés: Somatic HyperMutation)
SLPC	Célula Plasmática de corta vida (Short-Lived Plasma Cell)
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés: Signal Transducers and Activators of Transcription)
T-bet	(del inglés: T-box-containing protein expressed in T cells)
TBM	Macrófago de cuerpo tingible (del inglés: Tingible Body Macrophage)
TCR	Receptor del Linfocito T (del inglés: T- cell Receptor)
Tfh	Linfocitos T cooperadores foliculares (del inglés: T follicular helper cells)
Tfr	Linfocitos T regulatorios foliculares (del inglés: T follicular regulatory cells)
TGF- β	Factor de crecimiento transformante Beta (del inglés: Transforming Growth Factor beta)
Th	Linfocitos T cooperadores (del inglés: T helper cells)
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés: Toll-Like Receptor)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (del inglés: Tumor Necrosis Factor)
Tregs	Linfocitos T regulatorios (CD4+ CD25+ Foxp3+)
TRIS	Buffer 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
usBmem	Linfocito B de memoria sin cambio de isotipo de Igs
WT	Ratones silvestres C57BL/6 (del inglés: Wild Type)

Resumen

Uno de los últimos grandes avances en la evolución de los vertebrados fue el advenimiento de los ganglios linfáticos y la formación de centros germinales en los mamíferos placentarios. Los centros germinales, estructuras microanatómicas transientes e increíblemente dinámicas, son el escenario de expansión clonal de linfocitos B, diversificación de inmunoglobulinas y maduración de la afinidad; todos eventos claves para la generación de anticuerpos de alta afinidad que conforman el núcleo fuerte de la respuesta inmune humoral.

Los linfocitos B que experimentan la reacción de centro germinal se diferencian finalmente a células plasmáticas de larga vida o a linfocitos B de memoria y expresan un repertorio de anticuerpos altamente seleccionado, con mayor afinidad por el antígeno, fenómeno conocido como maduración de la afinidad. El gran número de interacciones moleculares y celulares que se suscitan en los centros germinales no solo tiene como objetivo la generación de clones altamente afines para un antígeno extraño, sino también la eliminación de aquellos clones que puedan reaccionar contra antígenos propios. Esto presenta un gran desafío para el organismo, ya que la aparición de células autorreactivas puede conducir a la generación de autoanticuerpos capaces de unirse a componentes propios, con la consecuente afectación y destrucción de órganos y tejidos. Por tal motivo, resulta imprescindible comprender la complejidad de interacciones celulares y moleculares involucrados en la reacción de centro germinal para intervenir, en consecuencia, eficientemente.

En los últimos años, se han dedicado cada vez más esfuerzos al estudio de las galectinas, una familia de proteínas de unión a glicanos conservadas evolutivamente implicadas en una amplia variedad de procesos biológicos, incluida la modulación del sistema inmune. En particular, Galectina-3, surge como una proteína involucrada en la respuesta inmune regulando y modificando el comportamiento tanto de células del sistema inmune innato como del sistema inmune adaptativo.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral proporcionan la primera evidencia de la participación de Galectina-3 como molécula clave en la reacción de centro germinal. En comparación con ratones *wild-type*, los ratones deficientes en Galectina-3 generan centros germinales espontáneos, mayor porcentaje de células secretantes de anticuerpos e hipergammaglobulinemia, niveles excesivamente elevados de IFN- γ en suero y desarrollan una enfermedad autoinmune de características similares al lupus. IFN- γ resulta fundamental para inducir y mantener estas alteraciones puesto que el bloqueo del mismo, en ratones deficientes en Galectina-3, reduce la formación espontánea de centros germinales y la producción de autoanticuerpos previniendo, así, la patología renal. A su vez, el uso de ratones quimera de médula ósea permitió evidenciar que la señalización intrínseca de Galectina-3 en los linfocitos B controla la formación espontánea de centros germinales.

De esta forma, los resultados expuestos en esta tesis, integrados junto a reportes previos, demuestran una dependencia completa entre la presencia de centros germinales espontáneos autorreactivos e IFN- γ en ratones deficientes en Galectina-3. Se revela así, un nuevo rol de Galectina-3 en la modulación de la respuesta inmune humoral, poniendo de manifiesto el potencial de esta vía para el diseño de terapias específicas en enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos.

Palabras clave: Centros Germinales; Autoinmunidad; Galectina-3; IFN- γ , Lupus

Summary

One of the last major advance in vertebrate evolution was the advent of lymph nodes and the formation of Germinal Centers in placental mammals. Germinal Centers, transient and incredibly dynamic microanatomic structures, are the site of B cell clonal expansion, somatic hypermutation, and affinity-based selection, all of which are required for the generation of the high-affinity antibodies that make up the core of the humoral immune response. B cells that undergo the germinal center reaction are ultimately differentiated into long-lived plasma cells or memory B cells and express a highly selected repertoire of antibodies, with increased affinity for the antigen, a phenomenon known as affinity maturation. The large number of molecular and cellular interactions that take place within the germinal centers not only aims to generate high-affinity clones to foreign antigens, but also to eliminate of those cells that can react strongly against self-antigens. This presents a great challenge for the organism, since the emergence of autoreactive cells can lead to the generation of autoantibodies capable of binding to their own components, resulting in the affectation and destruction of organs and tissues. For this reason, it is essential to understand the complexity of cellular and molecular interactions involved in the Germinal Center reaction in order to be able to intervene efficiently.

In recent years, increasing efforts have been devoted to the study of galectins, a family of evolutionarily conserved glycan-binding proteins implicated in a wide variety of biological processes including the modulation of the immune system. In particular, Galectin-3, emerges as a protein involved in both innate and adaptive immune responses.

The work included in this thesis provide the first evidence that Galectin-3 is a key molecule involved in the germinal center reaction. Compared to wild-type mice, Gal-3-deficient mice generate spontaneous germinal centers, evidence a higher percentage of antibody-secreting cells and hypergammaglobulinemia, produce excessively high levels of IFN- γ in serum and develop a lupus-like autoimmune disease. IFN- γ overproduction is essential to induce and maintain these alterations, since blocking IFN- γ signaling in Gal-3-deficient mice reduces the spontaneous formation of germinal centers and the production of autoantibodies, preventing renal pathology. In turn, the use of bone marrow chimeras made it possible to show that the intrinsic signaling of Galectin-3 in B cells controls the spontaneous formation of germinal centers.

Herein, the results presented in this thesis, integrated with previous reports, demonstrate a complete dependence of the presence of self-reactive Germinal Centers on IFN- γ in Gal-3-deficient mice. This reveal a new undefined role of Gal-3 expression in modulating humoral immune responses, highlighting the potential for therapeutic targeting of this pathway in autoimmunity.

Keywords: Germinal Centers; Autoimmunity; Galectin-3; IFN- γ , Lupus

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Primera Parte

RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR LINFOCITOS B

Visión general de la respuesta inmune humoral dependiente de Centros Germinales

Anatomía funcional de los Centros Germinales

Linfocitos T cooperadores foliculares

Evolución espacio-temporal de los Centros Germinales

Destinos B post Centro Germinal: Células Plasmáticas y Células B de memoria

Centros Germinales de larga vida y crónicos

1.1. Visión general de la respuesta inmune humoral dependiente de Centros Germinales

El sistema inmune tiene la fascinante habilidad de responder frente a sustancias extrañas o antígenos (Ag) produciendo, entre otros mediadores, inmunoglobulinas (Igs), una peculiar familia de proteínas con capacidad para unirse a Ags con una afinidad y especificidad extremadamente altas¹. Por esta razón, los linfocitos B (LiB), células productoras de Igs, emergen como una línea de defensa clave contra infecciones ya que los anticuerpos producidos no solo facilitan el *clearance* de los patógenos sino también previenen reinfecciones.

El exquisito poder de neutralización y opsonización de los anticuerpos ha hecho que las terapias basadas en anticuerpos sean una de las estrategias profilácticas y de intervención más exitosas en la clínica médica. Esto se evidencia en la innumerable cantidad de infecciones prevenidas y vidas salvadas a través de la vacunación. El CDC (del inglés: *Centers for Disease Control and Prevention*) estimó que, para los niños nacidos entre 1994 y 2013, la vacunación evitaría un estimado de 322 millones de enfermedades, 21 millones de hospitalizaciones y 732.000 muertes en el transcurso de sus vidas².

El efecto protector de los anticuerpos queda también manifestado en la eficacia que ha tenido la transferencia de sueros de pacientes sobrevivientes del virus del Ébola en la recuperación de pacientes recientemente infectados^{3, 4, 5} así como también otras afecciones^{6, 7}. De hecho, la inducción de anticuerpos de alta afinidad protectores es la base de prácticamente todas las vacunas exitosas. Pero es también remarcable que, incluso en el caso de infecciones para las cuales aún no se han desarrollado vacunas, como es el caso del VIH, en algunos individuos se generan anticuerpos potentes y ampliamente neutralizantes (bNAbs, del inglés: *Broadly Neutralizing Antibodies*). Estos bNAbs pueden suprimir la viremia en ratones, macacos y humanos^{8, 9} y muestran evidencia de extensivos procesos de hipermutación somática que se logran solo mediante la selección de LiB, impulsada por células T, en estructuras microanatómicas conocidas como Centros Germinales (CG)¹⁰. Estas estructuras, increíblemente dinámicas, aparecen en varias copias dentro de órganos linfoides secundarios cuando un organismo se expone a un antígeno por infección natural o inmunización¹¹.

Se ha puesto de manifiesto que los CGs son el sitio por excelencia de expansión clonal dependiente de antígeno, diversificación de inmunoglobulinas y maduración de la afinidad^{12, 13, 14, 15, 16}; todos eventos claves y necesarios para la generación de anticuerpos de alta afinidad que conforman el núcleo fuerte de la respuesta inmune humoral¹⁷. Dentro de los CGs, los LiB de CG

prolifera a una velocidad muy por encima de la que se evidencia en el resto de las células de otros tejidos en mamíferos, y sus genes de región variable de inmunoglobulina (IgV) se diversifican mediante Hipermutación Somática (SHM, del inglés: *somatic hypermutation*)^{18,19}, inducidos por la enzima "Deaminasa de citidina inducida por activación" (AID, del inglés *Activation-induced cytidine deaminase*)^{20, 21, 22}. Este proceso de SHM da como resultado la generación de clones mutantes que tienen una amplia gama de afinidades por el Ag disparador. Los LiB que experimentan la reacción de CG se diferencian finalmente a célula plasmática de larga vida (LLPC, del inglés: *long-lived plasma cells*) o a LiB de memoria (Bmem). Una cuestión fundamental es que los clones de LiB generados a través de la reacción de CG expresan un repertorio de anticuerpos altamente seleccionado, cuya afinidad aumenta con el tiempo. Este fenómeno se conoce como maduración de la afinidad^{23, 24, 25} e indica la presencia de procesos de selección dentro del CG que aseguran que las nuevas variantes de LiB con especificidades de anticuerpos inferiores o autorreactivas sean superadas por competidores de mayor afinidad²⁶.

Para que una respuesta humoral sea altamente efectiva, los LiB deben estar dirigidos contra el Ag correcto, expresar la clase de anticuerpo adecuada y unirse a su Ag con una afinidad lo suficientemente alta como para proporcionar al hospedador, protección inmunitaria a largo plazo. Estos tres atributos cardinales de los LiB que experimentaron la reacción de CG, específicos de Ag, emergen progresivamente bajo la cooperación, guía y soporte de un subgrupo específico de LiT CD4⁺ denominados linfocitos T foliculares cooperadores (Tfh, del inglés *T follicular helper cells*)²⁷. La reciente identificación de Bcl-6 como regulador maestro de la diferenciación Tfh^{28, 29, 30}, la demostración de que los Tfh son indefectiblemente requeridos para la colaboración con los LiB^{28, 29, 31} y la identificación de la importancia de IL-21 e IL-4 como mediadores producidos por los Tfh para ejercer su cooperación^{31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39} ha establecido a las células Tfh como un nuevo subtipo de célula T CD4⁺⁴⁰.

Dada la existencia de múltiples tipos de células que cohabitan en los CGs, es de vital importancia comprender todos los eventos celulares y moleculares involucrados en la inducción, evolución y contracción de estas estructuras para mejorar el diseño de vacunas y también para manipularlas en escenarios de autorreactividad y malignidad.

1.2. Anatomía funcional de los CGs.

Los CGs se forman dentro de folículos de LiB de órganos linfáticos secundarios, inmersos en una red de células estromales conocidas como células dendríticas foliculares (FDC, del inglés *follicular dendritic cells*) ⁴¹. En folículos que no contienen CGs (denominados folículos primarios), las FDCs desempeñan un papel organizativo fundamental, facilitando que los LiB se agrupen en conjuntos compactos o clústeres bien definidos ⁴². En folículos que contienen CGs (folículos secundarios), las FDCs se ubican dentro del mismo y desempeñan dos funciones fundamentales: por un lado retienen Ags intactos o nativos durante períodos prolongados de tiempo bajo la forma de complejos inmunes revestidos por Complemento, de forma que éstos sirvan para "testear" la afinidad de los nuevos BCRs mutados de los LiB que experimentaron SHM ^{41, 43, 44}; por otro lado, las FDCs ofrecen señales indispensables de sobrevivencia para los LiB de CG y la proliferación global de la reacción de CG ⁴⁵.

La formación de CGs comienza con la interacción e internalización del Ag por LiB en reposo ^{46, 47}, seguido por la migración del mismo hacia el límite entre el folículo de LiB y la zona T (borde T:B), donde reciben señales coestimuladoras por parte de LiT CD4⁺ cooperadores ^{48, 49}. Esta interacción desencadena un período de intensa proliferación en el que los LiB respondedores se ubican preferentemente en el exterior de los folículos de LiB ⁵⁰. Una fracción de estas células se agruparán en clústeres comprimidos en el interior del folículo de LiB, en estrecha coincidencia con la red de FDCs, dando lugar a un CG temprano. El clúster o grupo de LiB se mantiene principalmente gracias a la expresión de receptores acoplados a proteína G, como lo son Ebi2 ^{51, 52, 53, 54} y S1P2 ^{55, 56}.

Los LiB de CG son más grandes que los LiB *naïve* y muestran una morfología altamente polarizada, con bordes delanteros evidentes y urópodos extendidos ^{57, 58, 59}. Mientras que los LiB *naïve* rara vez se dividen, los LiB de CG se encuentran entre las células de mamíferos que se dividen más rápidamente, con un tiempo del ciclo celular estimado entre 6 y 12 h ^{58, 59}. Los LiB de CG pueden identificarse por la expresión de altos niveles de Fas y GL-7, se unen a la lectina PNA (del inglés: *Peanut Agglutinin*), pierden la expresión de IgD de superficie y sufren cambios en la expresión de CD38 (se regula negativamente en ratones y positivamente en humanos), entre otros marcadores ^{60, 61, 62, 63, 64, 65}. Un regulador crítico del fenotipo de los LiB de CG es el factor de transcripción Bcl-6 que actúa principalmente como un represor transcripcional ^{13, 66}. En los LiB, Bcl-6 se regula positivamente únicamente durante la reacción de CG ^{67, 68}, y los ratones que

carecen de Bcl-6 son incapaces de formar CGs o producir anticuerpos de alta afinidad ^{69,70}. Bcl-6 cumple al menos cuatro funciones importantes en la generación del fenotipo de LiB de CG. En primer lugar, Bcl-6 silencia la molécula antiapoptótica Bcl-2 en LiB de CG, lo que garantiza el mantenimiento de un estado proapoptótico ^{71, 72}, fundamental para la selección basada en la afinidad y la prevención de la autoinmunidad que podría surgir como resultado de los eventos de SHM. En segundo lugar, Bcl-6 contribuye a la capacidad de un LiB de CG para tolerar el daño al ADN inducido por una proliferación rápida y por la actividad de AID ^{73,74}. Tercero, Bcl-6 juega un papel importante en la preservación de la identidad celular de los LiB de CG al silenciar el regulador maestro de células plasmáticas Blimp-1, regulando así la salida del CG al destino de célula plasmática (CP) ⁷⁵. Finalmente, Bcl-6 regula negativamente la expresión de mediadores claves en la señalización del BCR y de CD40, posiblemente ayudando a ajustar la capacidad de respuesta de los LiB de CG a señales selectivas ^{75, 76}.

Una característica de los CGs maduros es su división en dos compartimentos, o "zonas". El polo del CG más cercano a la zona de LiT en los ganglios linfáticos (LN, del inglés: *lymph node*) o en el bazo, y ausente en gran medida de FDCs, se conoce como Zona Oscura (DZ, del inglés: *Dark Zone*). El polo distal a la zona T, el más cercano a la cápsula en LNs o a la zona marginal en el bazo, y rico en FDCs, se conoce como zona clara (LZ, del inglés: *Light Zone*). Se denominan así debido a que la LZ aparece "más clara" en histología usando tinciones tradicionales como H&E, debido a la distribución más escasa de núcleos de linfocitos entre una red estromal más abundante ¹².

La DZ consiste principalmente en un grupo compacto de LiB altamente proliferantes, conocidos clásicamente como "centroblastos", que expresan fuertemente el receptor de quimiocinas CXCR4 ^{17, 58, 77, 78}. El estroma de la DZ consiste en una delicada red de células reticulares que producen la quimiocina CXCL12 (el ligando para CXCR4) que mantiene a los LiB de DZ lejos de la red de FDCs ^{79,80}. Los LiB de DZ tienen alta expresión de AID y ADN polimerasa η (Polh, que introduce mutaciones puntuales en el ADN al reparar lesiones inducidas por AID ^{17, 78, 81}. Este patrón de expresión sugiere que la DZ es el sitio de SHM de Igs y, por lo tanto, donde se generan variantes clonales con diferentes afinidades para el antígeno ^{17, 78}.

La LZ es menos compacta y más heterogénea que la DZ. Además de los LiB de CG y las FDCs, la LZ contiene una gran proporción de LiB *naïve* ⁵⁷ y una población más pequeña pero crucialmente importante de linfocitos Tfh. Los Tfh desempeñan un papel fundamental en la selección positiva de LiB con mayor afinidad, impulsando su proliferación y diferenciación hacia

LLPC o a Bmem^{17,58,81,82}. Recientemente se ha identificado también un subconjunto de células T CD4⁺ residentes de CGs que expresan el regulador maestro Foxp3, propio de los LiT reguladores (Treg), y que a su vez comparte muchas características fenotípicas con los Tfh^{83,84,85}. El origen preciso, la especificidad antigénica y el mecanismo de regulación de estas células T foliculares regulatorias (Tfr, del inglés: *follicular regulatory T cells*) se encuentran actualmente bajo un intenso trabajo de investigación^{86,87}. Los LiB de LZ se conocen tradicionalmente como "centrocitos". Estas células muestran un fenotipo activado, que incluye una mayor expresión de los marcadores de activación CD86 y CD83^{17,78}. Otras características, como lo son la sobreexpresión de firmas genéticas asociadas con la activación de las vías CD40 y BCR, y de Myc también son indicativas de un estado de activación^{17,78,88}. En conjunto, la presencia de Ag, la cooperación provista por los Tfh y el fenotipo activado de los LiB residentes sugieren que la LZ es el sitio de selección de variantes de SHM de alta afinidad.

Además de las células mencionadas anteriormente, los CGs también contienen macrófagos de cuerpo tingible (TBM, del inglés: *tingible-body macrophages*). Los TBMs fagocitan y eliminan a los LiB apoptóticos que son productos frecuentes de los procesos de selección en el CG¹. Se documentaron defectos en la función de los TBMs en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES)⁸⁹. A su vez, interfiriendo o afectando la capacidad de los TBMs para eliminar células moribundas, se provoca una enfermedad similar al lupus^{90,91}. Esta información sugiere que los TBMs pueden limitar la aparición de autorreactividad en el CG y así contribuir al control de autoinmunidad.

La topografía de ganglios linfáticos con la distribución de las principales moléculas que intervienen en la distribución geográfica de las poblaciones celulares se ilustra en la Fig. 1. El interior de los ganglios linfáticos se puede subdividir, a gran escala, en tres áreas importantes: médula, paracorteza y corteza. La médula se encuentra adyacente a los linfáticos eferentes y es rica en senos medulares. Allí, las CP recientemente diferenciadas producirán anticuerpos para ser liberados en la linfa^{92,93}. La paracorteza es rica en LiT, que se acumulan formando la zona T, y en células reticulares fibroblásticas, que forman una red estromal que guía la migración de linfocitos^{94,95}. La corteza, ubicada justo debajo de los senos subcapsulares, es el destino final de los LiB. Allí, los LiB se agrupan en folículos discretos, densamente compactos, rodeando a las FDC. Los procesos migratorios que facilitan la distribución celular en los órganos linfáticos secundarios están comandados, principalmente, por las quemoquinas CCL19/21, CXCL13 y CXCL12. Éstas son sensadas por los receptores de citoquinas expresados en los distintos tipos celulares: CCR7

(receptor expresado en LiT naïve, el cual sensa CCL19/21), CXCR5 (expresado por LiB naïve y LiB de CG, el cual sensa CXCL13) y CXCR4 (receptor expresado por LiB de DZ, o centroblastos, el cual sensa CXCL12) (Fig. 1).

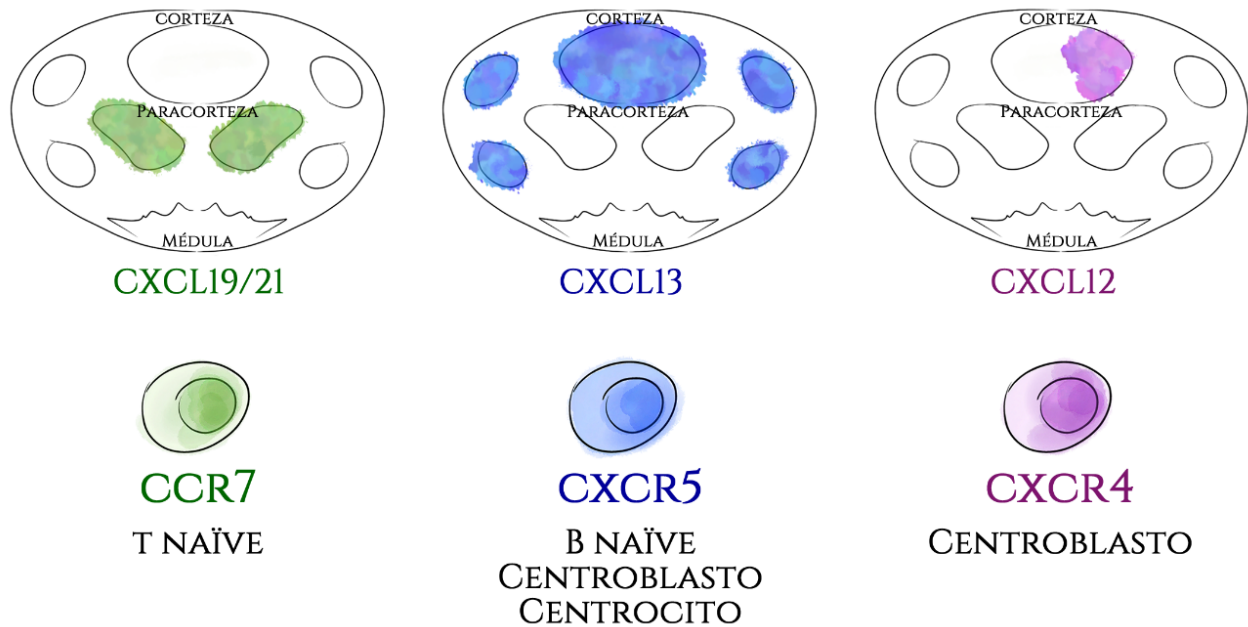


Fig. 1. Topografía representativa de ganglios linfáticos y distribución de los principales ligandos de migración de LiB y LiT.

Distribución de quemoquinas claves involucradas en la ubicación geográfica y en la migración de LiB y LiT en ganglios linfáticos. CCL19/21, los ligandos para CCR7 (receptor expresado en LiT naïve), son producidos por células dendríticas en la paracorteza. CXCL13, el ligando para CXCR5 (expresado por LiB naïve y LiB de CG, entre los que se incluyen centroblastos y centrocitos), es producido por células reticulares marginales en el seno subcapsular y por FDCs en folículos de LiB. CXCL12, el ligando para CXCR4 (receptor expresado por LiB de DZ, o centroblastos), es producido por células reticulares de la zona oscura que se encuentran en CGs en curso.

La composición de células involucradas en la reacción de CG es ilustrada en la Fig. 2. La composición y funcionamiento de los CGs, y las implicancias de su génesis en el organismo que los desarrolla, fueron extensivamente desarrollados en excelentes revisiones producidas por los grupos dirigidos por Vitorica ^{1,96}, Vinuesa ^{10,86}, Crotty ^{40,97} y Qi ⁹⁸.

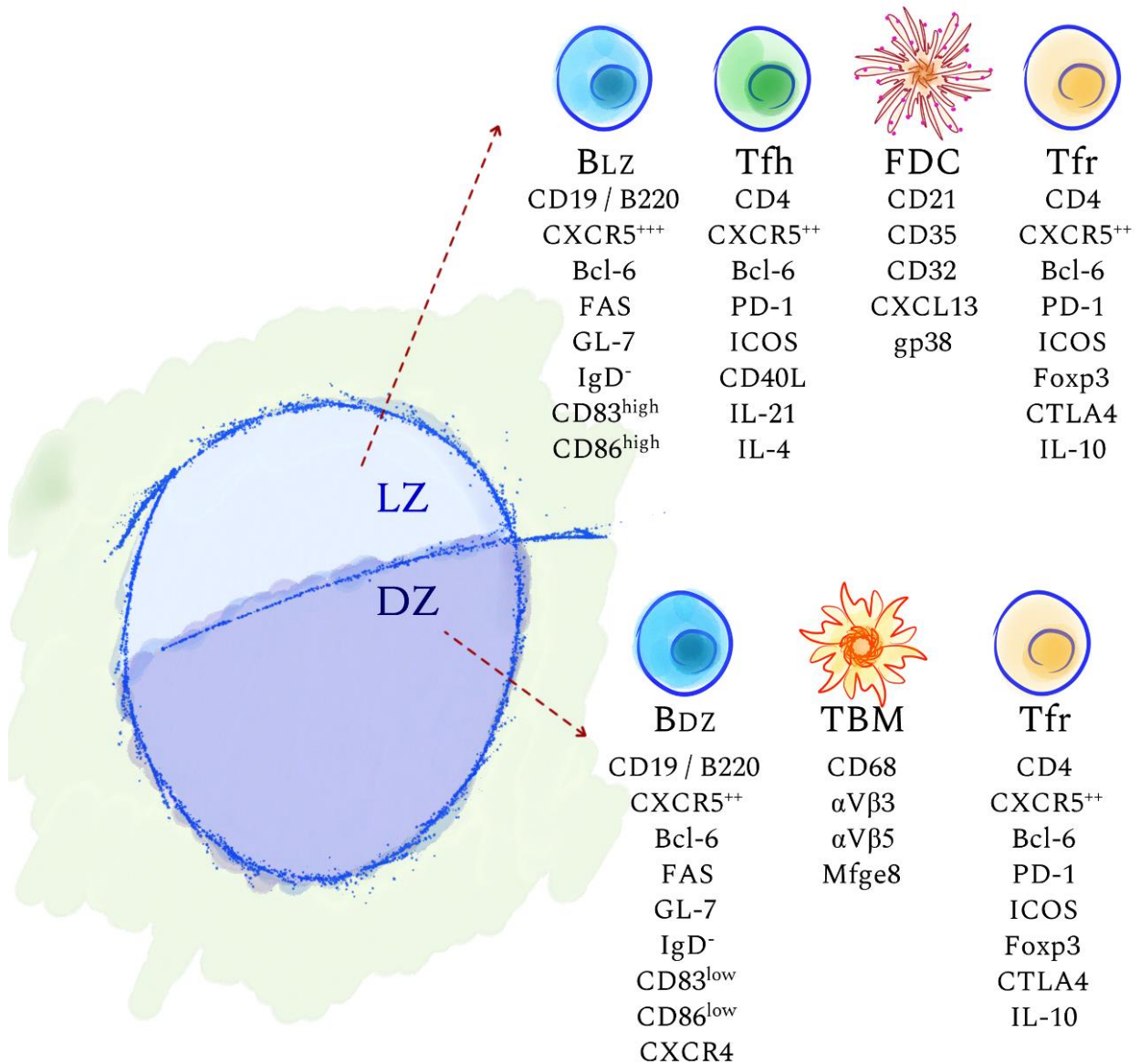


Fig. 2. Representación esquemática de la anatomía de un CG maduro y de las principales células involucradas en él.

El CG se divide en dos compartimentos anatómicos, DZ y LZ, con funciones particulares distinguibles: en la DZ los B_{DZ} proliferan intensamente y efectúan SHM, mientras que, en la LZ, los B_{LZ} sufren selección basada en la afinidad por el Ag, llevada a cabo por los Tfh. Se indica en cada zona la composición celular y los principales marcadores moleculares que identifican a cada tipo celular. DZ: zona oscura; LZ: zona clara; B_{DZ}: LiB de zona oscura, o centroblasto; B_{LZ}: LiB de zona clara, o centrocito; Tfh: LiT folicular cooperador; Tfr: LiT folicular regulatorio; FDC: célula dendrítica folicular; TBM: Macrófago de cuerpo tingible.

1.3. Linfocitos T foliculares cooperadores (Tfh).

A comienzos de este siglo, varios grupos describieron en humanos la capacidad preferencial de un subtipo particular de LiT CD4⁺ CXCR5⁺ de ayudar a LiB a producir anticuerpos ^{99, 100, 101}. CXCR5 es una molécula clave en la ubicación espacial de las células, puesto que es el receptor de quimiocina que promueve la migración de LiB y LiT hacia los folículos de LiB en respuesta a CXCL13 (Fig. 1) ^{102, 103}. Estos estudios fueron los primeros en utilizar el término Tfh para referirse a LiT CD4⁺ capaces de cooperar con LiB en folículos. No obstante, estos trabajos no fueron suficientes para establecer, convincentemente, a los Li Tfh como un linaje diferente y único de LiT CD4⁺, por lo que la comunidad científica no los reconoció como un linaje de diferenciación diferente de los establecidos al momento (Th1, Th2, Treg o Th17) ^{104, 105, 106}. En el 2009 fueron publicados tres estudios independientes (Vinuesa, Dong y Crotty) en los cuales se demostró que los Tfh requieren un programa transcripcional imprescindible para su desarrollo, comandado por Bcl-6 ^{28, 29, 30}. Estos trabajos proporcionaron la primera evidencia de que los Tfh se desarrollan en forma independiente de los LiTh1, Th2 y Th17. En el último lustro, numerosos trabajos de alto impacto documentaron en profundidad el fenotipo, las propiedades migratorias y de localización, los mecanismos moleculares que utilizan para promover la respuesta de CG y, en especial los programas transcripcionales que regulan su diferenciación, función y supervivencia. Actualmente hay consenso respecto a la expresión de moléculas que los caracterizan. Así, la identidad y fenotipo Tfh está representada por: CD4⁺ CD44⁺ CD62L⁻ CXCR5⁺ PD-1⁺ ICOS⁺ SAP⁺ BTLA4⁺ CCR7^{low} PSGL-1^{low} EBI2^{low} (Figura 2) ¹⁰. En ratones, la diferenciación hacia el linaje Tfh está facilitado por las citoquinas IL-6 e IL-21 ^{31, 40, 107, 108, 109, 110}. En humanos, un gran número de trabajos indican que varias citoquinas favorecen la diferenciación de Li Tfh, con un rol prominente de TFG-β, IL-12 e IL-23 ^{111, 112, 113}. Por otra parte, IL-2 es un potente inhibidor de la diferenciación Tfh ^{114, 115}.

Los Tfh ejercen su función cooperadora para con los LiB principalmente a través de CD40L, IL-21 e IL-4. La señal provista por CD40L es requerida para la supervivencia de LiB de CG, para efectuar switch de isotipo (CSR, del inglés: *class-switch recombination*) y para la diferenciación a LLPC y Bmem ^{116, 117, 118}. IL-21 es la principal citoquina producida por los Tfh y favorece que Bcl-6 se mantenga expresado en LiB de CG, controlando así el mantenimiento de los CGs y la óptima maduración de la afinidad ^{32, 36}. Los Tfh también pueden producir otras citoquinas, y esto depende en gran medida de la naturaleza del estímulo que induce la formación

del CG. Por ejemplo, patógenos que promueven respuesta tipo Th₂, inducen una población de Tfh altamente productora de IL-4 y, en contraste, estímulos que favorecen respuestas Th₁ inducen Tfh que secretan IFN- γ ³³. IL-4 e IFN- γ apoyan el CSR (en ratón) de IgM a IgG1 e IgG2a/c respectivamente,^{33, 119}. Estudios muy elegantes publicados recientemente por el grupo de investigación del laboratorio del Dr. Craft mostraron que, los Tfh maduran fenotípica y transcripcionalmente a lo largo del curso de la respuesta de CG, secretando en primer lugar IL-21 (el cual favorece la SHM y la consecuente maduración de la afinidad) y luego IL-4 (favoreciendo los procesos de selección de los clones B y la diferenciación a LLPC)³⁹.

1.4. Evolución espacio-temporal de los CGs.

La cinética de aparición y desaparición de los CGs puede variar mucho dependiendo del sistema experimental, de la naturaleza del Ag con el cual se inmunice, o del microorganismo infectante, y comprende desde algunas semanas a varios meses o incluso más. Los eventos principales se resumen en la Figura 3.

Primer evento: encuentro con el Ag. El Ag llega a los órganos linfáticos por vía sanguínea o linfática, o bien es transportado por células dendríticas convencionales. Los LiB que contactan con el Ag aumentan la expresión de CCR7 y migran hacia el límite de la zona T-B, denominada región interfolicular, o borde T-B, donde proliferan y forman interacciones prolongadas con LiT^{49, 120}. Por otro lado, en la zona T las células dendríticas presentan péptidos antigénicos en el contexto del MHC II (MHCp) a LiT CD4⁺. Estos LiT CD4⁺ específicos de Ag aumentan la expresión de CXCR5 y migran a la zona interfolicular para interactuar con los LiB específicos para el mismo Ag⁹⁶.

Segundo evento: Interacciones en el borde T-B. Los LiB tienen el Ag internalizado y procesado, y lo presentan en su superficie bajo la forma de MHCp. La interacción con LiT afines al mismo Ag produce señales que promueven la proliferación y diferenciación de los LiB. Este es un evento de competencia entre los clones de LiB¹²¹, y solo aquellos con mayor afinidad por el Ag obtienen cooperación por parte de los LiT y continúan el camino de diferenciación. El camino de diferenciación de los clones B puede ser alguno de los siguientes: (1) Los LiB migran al centro del folículo para generar CG^{51, 54, 121, 122}; (2) Los LiB se diferencian a plasmoblastos tempranos, de corta vida, y migran al exterior de los folículos para comenzar a producir anticuerpos, en su mayoría de isotipo IgM^{123, 124, 125}; y (3) los LiB se diferencian a Bmem sin experimentar CSR¹²⁶. A su vez, esta

interacción T-B favorece la diferenciación final de los LiT a Li Tfh, los cuales migran también al centro del folículo ^{125, 127}.

Tercer evento: CG temprano. Los LiB migran hacia el centro del folículo donde proliferan intensamente e inician SHM dirigida por AID. La proliferación de LiB origina agrupamientos o clústeres que crecen progresivamente de tamaño y que comienzan a poblar la red de FDCs. Durante este proceso, los blastos de LiB desplazan a los LiB IgM⁺ IgD⁺ (B naïve), lo que da como resultado la formación de la zona del manto alrededor del CG. Finalmente, el CG se establece por completo y se polariza funcional y fenotípicamente ^{1, 14}.

Cuarto evento: CG maduro. Los CG se polarizan en dos compartimentos o zonas: una LZ, que contiene FDCs, LiB de LZ (también conocidos como "centrocitos"), y una alta densidad de Li Tfh; y una DZ, que contiene LiB de DZ que proliferan intensamente (también conocidos como "centroblastos") ^{17, 58, 79}. Utilizando *in situ intravital photoactivation* (sistema que permite visualizar patrones de migración celular durante muchas horas excitando regiones micrométricas con altísima precisión) se pudo observar que, la LZ se repuebla constantemente por la llegada masiva de LiB de DZ (aproximadamente un 50% de los LiB de CG migran desde la DZ hacia la LZ en 4 h), y menos del 10% de los LiB de LZ regresan a la DZ durante el mismo período de 6 horas ^{17, 96}. Modelos matemáticos estimaron que aproximadamente entre un 10%-30% de los LiB que llegan a la LZ son seleccionados para reingresar a la DZ (el resto muere por apoptosis o sale del CG) ^{17, 128}. Estos ciclos de migración de los LiB de CG entre zonas conducen finalmente a la maduración de afinidad. Por otra parte, estudios sumamente sofisticados llevados a cabo por el grupo del Dr. Victora demostraron que los Tfh en esta etapa pueden migrar entre CGs vecinos en el mismo órgano linfático ¹²⁹.

Quinto evento: Disolución del CG. Los CGs comienzan a disiparse; los LiB disminuyen en número y los TBM, con funciones fagocíticas claves, se vuelven más evidentes. El inicio de la disolución de un CG puede variar sustancialmente (de unos pocos días a varios meses después de la maduración del CG), dependiendo del modo de encuentro del antígeno y su naturaleza química y biológica.

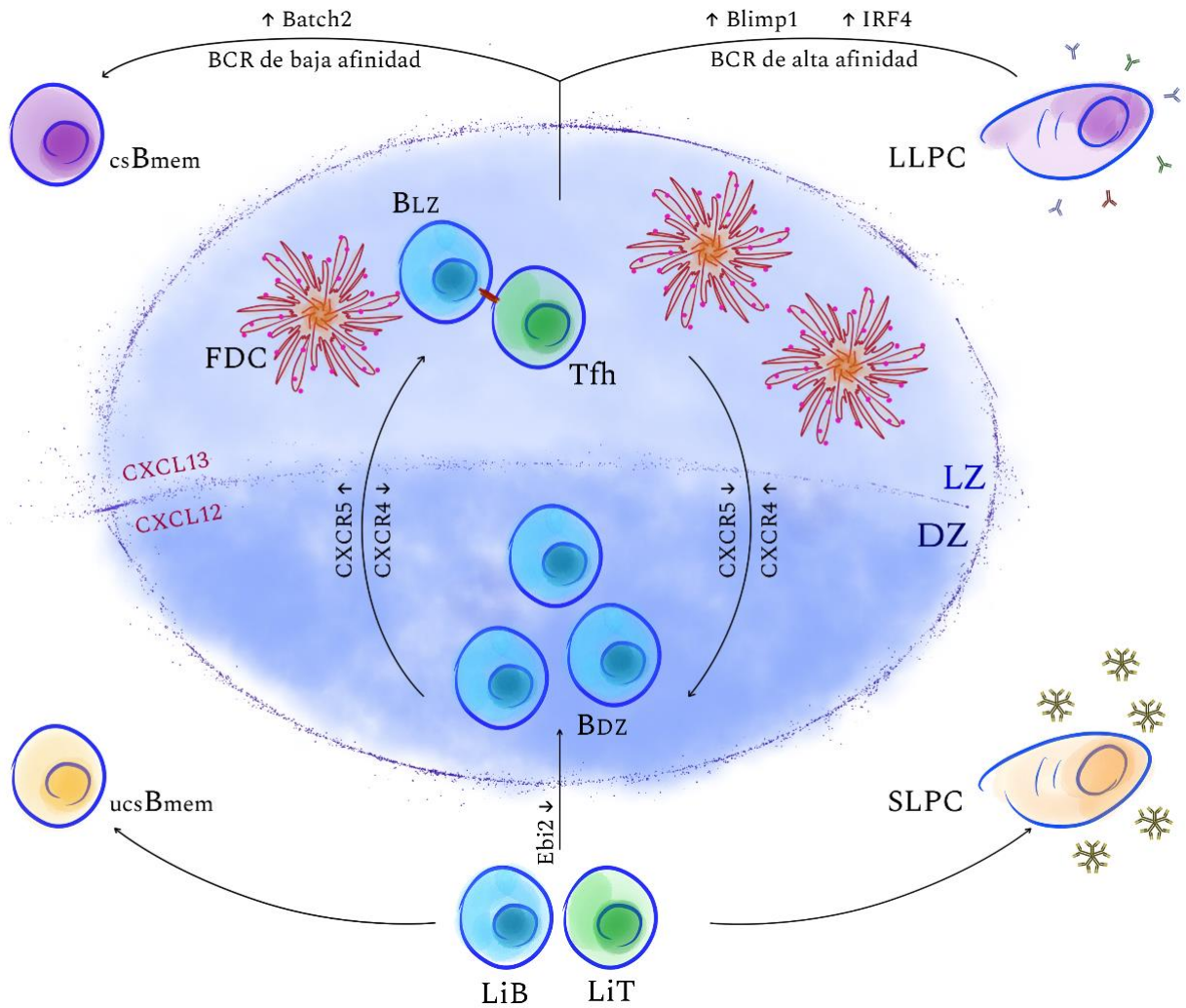


Fig. 3. Dinámica de LiB en los CGs.

Las interacciones en el borde T-B entre LiB y LiT afines para el mismo Ag provoca en los LiT la diferenciación hacia el fenotipo Tfh y en los LiB la diferenciación hacia alguno de los siguientes destinos: 1) ucsBmem (del inglés: *unswitched memory B cells*), el cual no experimenta CSR; 2) SLPC, células de corta vida productoras de anticuerpos tempranos de isotipo IgM; o 3) LiB de CG. Los LiB que han optado por el camino de diferenciación a CG migran hacia el centro del folículo donde proliferan intensamente y efectúan SHM en la DZ. Los BDZ que han experimentado SHM son seleccionados en base a su afinidad por el Ag en la LZ por los Tfh específicos para el mismo Ag. Los LiB de CG migran sucesivas veces entre la DZ y la LZ guiados por la expresión de quemoquinas (CXCL13 y CXCL12) y sus respectivos receptores (CXCR5 y CXCR4). Luego de que los LiB sean seleccionados positivamente por los Tfh, los mismos pueden diferenciarse a LLPC, células de larga vida que se alojarán principalmente en médula ósea, productoras de anticuerpos altamente afines al Ag y de isotipos diferentes al IgM, o bien a csBmem (del inglés: *switched memory B cells*), células específicas de Ag que patrullarán órganos linfáticos secundarios y que tienen el potencial de disparar reacciones de CG rápidas en posteriores contactos con el Ag o reinfecciones. Se muestran también los principales factores de transcripción involucrados en diferentes procesos de diferenciación. DZ: zona oscura; LZ: zona clara; BDZ: LiB de zona oscura, o centroblasto; BLZ: LiB de zona clara, o centrocito; Tfh: LiT folicular cooperador; FDC: célula dendrítica folicular; SLPC: célula plasmática de corta vida; LLPC: célula plasmática de larga vida; ucsBmem: LiB de memoria sin cambio de isotipo; csBmem: LiB de memoria con cambio de isotipo; BCR: receptor del LiB.

1.5. Destinos de LiB post CG: Células Plasmáticas y Células B de memoria.

Para ejercer sus funciones efectoras o de memoria, los LiB deben diferenciarse a CP o Bmem, respectivamente. La elección entre estos destinos puede ocurrir en dos etapas distintas: primero, en el borde T-B, donde los LiB recientemente activados eligen entre ingresar al interior del folículo y originar CGs o diferenciarse a CP o Bmem; y en segundo término, dentro del propio CG, los LiB de CG seleccionados positivamente interrumpen su dinámica intra-CG para salir del mismo diferenciándose nuevamente a CP o Bmem⁹⁶.

Varios estudios han demostrado que la adquisición de un fenotipo de CP se ve facilitada por una mayor afinidad, tanto en la respuesta temprana (borde T-B) como en la más tardía (en CGs)^{123, 130, 131}, mientras que un estudio reciente sugiere que los LiB de baja afinidad se reclutan preferencialmente en el pool de células de memoria¹³². El mecanismo por el cual la afinidad puede promover la diferenciación de CP o Bmem aún no está establecido, aunque algunas teorías respaldan la idea de que podría depender de las señales de ayuda provistas por los Tfh y el BCR.

El mecanismo molecular que subyace a la diferenciación de los LiB de CG en células Bmem aún sigue sin esclarecerse^{133, 134}. Aunque aún no se ha identificado ningún factor de transcripción maestro del perfil Bmem, una alta expresión de Bach2 en LiB de baja afinidad puede favorecer su diferenciación hacia Bmem¹³². Los impulsores moleculares de la diferenciación de LiB de CG hacia el destino de CP están mejor descritos^{135, 136}. La clave del proceso de diferenciación a CP es la activación del factor de transcripción maestro de CPs, Blimp1 (Prdm1)¹³⁷, que entre muchas otras funciones^{138, 139}, ayuda a disminuir la expresión de factores de transcripción tales como Pax5 y Bcl-6, responsables del mantenimiento de la identidad de Li B y de LiB de CG, respectivamente¹³⁶.

1.6. CGs de larga vida y crónicos

La duración de un CG puede variar mucho según la naturaleza del estímulo inmune. Mientras que los antígenos proteicos adsorbidos a alum en general inducen CG de corta duración que se disipan dentro del primer mes después de la inmunización, ciertas vacunas sintéticas, infecciones virales o la microbiota intestinal pueden inducir CGs que permanecen activos por períodos de tiempo mucho más largos (¿o indefinidamente?)^{140, 141, 142, 143}. Las reacciones prolongadas de CGs pueden permitir que las células alcancen un mayor grado de maduración de su afinidad^{144, 145} pero por otro lado, períodos prolongados de SHM en CGs crónicos puede

provocar tanto la aparición de variantes autorreactivas que finalmente se escapan a la selección negativa, ocasionando autoinmunidad ¹⁴⁶, como también puede promover la inestabilidad genómica y la aparición de linfomas de LiB ¹⁴⁷.

A pesar de la relevancia en ciertos contextos de reacciones prolongadas de CGs, aún se desconocen qué requisitos son necesarios para el mantenimiento a largo plazo del CG y las reglas que gobiernan la dinámica de la selección de células ⁹⁶.

Es importante destacar también que se ha demostrado que las Bmem pueden volver a entrar a un CG y diversificar aún más sus BCR ^{81, 148}. Por lo tanto, es razonable especular que las respuestas crónicas quizás sean necesarias para la generación de variantes de LiB altamente mutados, como aquellos que producen anticuerpos altamente neutralizantes para el HIV o influenza ^{149, 150, 151}.

INTRODUCCIÓN

Segunda Parte

TOLERANCIA B Y AUTOINMUNIDAD

Centros Germinales espontáneos y autoinmunidad
Factores que contribuyen a la formación espontánea de Centros Germinales

2.1. CGs espontáneos y autoinmunidad.

La activación de una respuesta robusta de CG y la consecuente producción de anticuerpos de alta afinidad son requisitos clave para la inmunidad humoral a largo plazo, así como también la base de las estrategias de vacunación más efectivas. Sin embargo, tanto la diversificación del repertorio de LiB por recombinación V(D)J en médula ósea, como la modificación de la especificidad del BCR en CGs por mutagénesis aleatoria de los genes que codifican para la región variable de inmunoglobulinas, conllevan el riesgo de generar clones de LiB capaces de producir anticuerpos autorreactivos patogénicos ¹⁵². En las últimas décadas, se ha profundizado mucho sobre los diversos mecanismos que evitan que los LiB recientemente generados autorreactivos experimenten activación y diferenciación de células plasmáticas ^{153, 154, 155}. Estos mecanismos de autotolerancia operan controlando a LiB inmaduros durante su ontogenia en médula ósea, lugar en el que las células están aisladas, en gran parte, de encuentros con antígenos extraños. Si bien aún se desconocen con certeza los mecanismos de control que operan en los CGs para evitar que clones autorreactivos permanezcan sin ser eliminados, se sabe que éstos no son absolutos ya que clones autorreactivos se escapan de los mismos ¹⁵⁶. Esto queda evidenciado en diversos reportes que demuestran que LiB productores de autoanticuerpos ejecutan extensos ciclos de SHM y CSR ¹⁵⁷. De acuerdo con esta idea, se observan CGs espontáneos en varios modelos murinos de lupus como así también alteraciones intrínsecas en los LiB y en vías de señalización claves en la generación de CGs ^{158, 159, 160, 161, 162, 163}.

Los LiB autorreactivos se pueden reclutar en el CG como células que desconocen su autorreactividad o que se han revigorizado de un estado anérgico. Diversos estudios efectuados con *reverse vaccinology* esclarecieron el origen de las células B autorreactivas. Si bien algunos de los clones autorreactivos que experimentan la reacción de CG, derivan de LiB primarios autorreactivos anérgicos ^{160, 161}, la mayoría de los clones autorreactivos derivados de CGs provienen de precursores de LiB no autorreactivos que adquieren su autorreactividad dentro del CG ^{160, 163, 164, 165}.

La aparición de CGs espontáneos de naturaleza autorreactiva fue documentado tanto en modelos murinos autoinmunes así como también en humanos con diversas patologías autoinmunes tales como Lupus Eritematoso Sistémico (LES), síndrome de Sjögren, artritis reumatoidea, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmune ^{166, 167, 168, 169}. El desarrollo de CGs sin ningún tipo de desafío inmune se observó por primera vez en ratones (NZBxNZW) F₁ (NZB/W)

autoimmune-prone ¹⁷⁰. Luzina y colaboradores extendieron aún más los estudios de CGs espontáneos y demostraron que éstos no eran generados por infecciones manifiestas, e incluso tampoco por infecciones asintomáticas. En este estudio se documentó que varias cepas de ratones *autoimmune-prone* (NOD, PN, NZB, NZB/W, MRL *lpr/lpr*, MRL^{+/+}, B6 *lpr/lpr*, y BXSB machos) desarrollaron CGs espontáneos con análisis de sangre negativos para infecciones bacterianas y virales ¹⁶⁶. A su vez se observó que pueden desarrollarse estructuras linfoides transitorias en tejidos y órganos blancos de inflamación en pacientes con autoinmunidad (denominadas folículos terciarios o CGs ectópicos), incluidos los riñones en nefritis lúpica y articulaciones de pacientes con artritis reumatoidea ^{171, 172, 173, 174}. Por otra parte, los títulos de autoanticuerpos séricos en muchos casos aumentan progresivamente en el tiempo, incluso años antes del inicio de las manifestaciones de la enfermedad, y persisten en los individuos a pesar de una fuerte inmunosupresión, debido en gran parte a que las LLPC autorreactivas generadas en los CGs espontáneos autorreactivos son refractarias a muchos de estos tratamientos. Además de que los CGs son un sitio de generación de LLPC autorreactivas, la evidencia demuestra que los LiB autorreactivos pueden dirigir la formación de CGs espontáneos iniciando la expansión de Li Tfh afines ¹⁷⁵.

2.2. Factores que contribuyen a la formación espontánea de CGs.

Alteraciones en la señalización a través del BCR. Diversos estudios independientes, en modelos animales, han demostrado claramente que una señalización desregulada dependiente del BCR es suficiente para promover autoinmunidad. Mutaciones en la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) en los LiB producen una señalización mejorada *downstream tanto* para BCR como para TLRs ^{158, 176, 177}. Aunque la tolerancia central se mantiene en ratones WASp^{-/-}, LiB T2 exhiben una proliferación aumentada ¹⁷⁷. Varios grupos ^{158, 165} demostraron que la eliminación condicional de WASp en LiB da como resultado la formación espontánea de CGs, altos títulos de anticuerpos antinucleares, expansión de Tfh y glomerulonefritis mediada por complejos inmunes. En humanos, los pacientes con WAS muestran altas tasas de autoinmunidad humoral ¹⁶⁴. Por otra parte, la delección intrínseca en los LiB del gen que codifica para la tirosina quinasa de la familia SRC, Lyn, también promueve la autoinmunidad espontánea ¹⁷⁸. En particular, LiB Lyn^{-/-} exhiben un flujo de calcio mejorado mediado por el BCR ¹⁷⁹. De forma similar, la variante PTPN22^{R620W} asociada a autoinmunidad también modula la señalización vía BCR ^{180, 181, 182}. PTPN22 regula

negativamente la señalización downstream de ambos BCR y TCR. Un polimorfismo de un solo nucleótido en *PTPN22* (C1858T; R620W) se asocia con una mayor susceptibilidad a varias enfermedades autoinmunes¹⁸³, incluidas LES¹⁸⁰, diabetes tipo 1¹⁸¹ y artritis reumatoidea¹⁸².

Alteraciones en la señalización de los TLRs. También se ha podido evidenciar autoinmunidad dependiente de CGs cuando ocurren desregulaciones en las vías de señalización de TLRs. Por ejemplo, la señalización a través de MYD88 intrínseca en los LiB es crucial para la formación espontánea de CG y la producción de anticuerpos antinucleares en varios modelos de lupus de ratón^{158, 161, 184}. De los TLR dependientes de MYD88, la señalización de TLR7 en los LiB es la más vinculada a autoinmunidad mediada por autoanticuerpos. La sobreexpresión de TLR7 en cepas de ratón propensas al lupus que llevan la translocación *Yaa*, o en ratones transgénicos TLR7, da como resultado autoinmunidad sistémica caracterizada por formación de CGs espontáneos^{169, 185}. Además, polimorfismos en TLR7 se han relacionado con el desarrollo de LES en humanos^{186, 187}.

IL-6, IL-21 y BAFF. Además de las interacciones entre LiB y Tfh afines en los CGs, la señalización provista por las citoquinas influye notablemente en la biología de los CGs, tanto en respuestas a infecciones como en autoinmunidad. Con relación a IL-21, se evidenció que los niveles séricos de la misma están aumentados en LES tanto en humanos como en ratones^{146, 188, 189}. La delección del IL-21R o el bloqueo terapéutico de IL-21 limita la autoinmunidad en ratones MRL.Fas^{lpr} y BXSB-*Yaa* y, mecanísticamente, es esencial la presencia del IL-21R en los LiB para este efecto^{188, 190, 191, 192}. En cooperación con la IL-21, la citocina proinflamatoria IL-6 promueve la formación de LiB de CG y de Tfh. Aunque aún es controvertido el hecho de que IL-6 sea requisito esencial para la diferenciación a Tfh^{31, 108, 193}, IL-6 promueve la diferenciación temprana de Tfh al inducir una expresión transitoria de Bcl-6 en LiT CD4⁺ específicos de Ag³⁰. En consonancia con esta idea, el bloqueo de IL-6R con tocilizumab disminuyó los niveles de anticuerpos específicos anti-dsDNA y plasmoblastos circulantes en ensayos clínicos en fase inicial en pacientes con LES¹⁹⁴. Curiosamente, además de las células dendríticas y otros subconjuntos mieloides, los LiB activados producen IL-6, lo que sugiere que la IL-6 derivada de LiB podría iniciar el desarrollo de Tfh y favorecer la formación espontánea de CG en LES^{195, 196}. Finalmente, aunque la autoinmunidad sistémica en ratones Baff transgénicos se produce independientemente de LiT, los Tfh son una fuente importante de producción local de Baff dentro de los CGs¹⁹⁷. Aunque el

BAFF derivado de células Tfh es redundante para la formación de CGs, el Baff derivado de LiT promueve la selección de clones B de CG de alta afinidad, implicando de este modo a Baff en la patogénesis de autoinmunidad dependiente de CGs.

IFNs. Además de las importantes funciones durante las respuestas inmunes antivirales, la familia de IFN tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ e IFN- ω) se ha implicado en la patogénesis de diversas autoinmidades sistémica. Por ejemplo, un subconjunto prominente de pacientes con LES muestra niveles aumentados de transcritos inducidos por IFN tipo I en células mononucleares de sangre periférica, un fenómeno denominado "*interferon signature*"^{198, 199, 200}. Mecanísticamente, se ha propuesto que la activación dependiente de TLR de células dendríticas plasmacitoides por complejos inmunes que contienen ácidos nucleicos favorece el LES a través del aumento de la producción de IFN tipo I. Es importante destacar que, además de los IFN tipo I, la señalización de IFN tipo II (IFN- γ) también se ha visto implicada en la patogénesis de LES en modelos animales y en humanos^{168, 198, 201, 202}. Mientras que la señalización intrínseca de IFN tipo I en LiB es redundante para la autoinmunidad humoral en quimeras WAS, IFN- γ promueve la producción de autoanticuerpos derivados de CGs en diversos modelos de lupus tales como Roquin^{san/san}, B6.*Sle1b* y quimeras WAS^{162, 163, 168}. La formación espontánea de CGs requiere la señalización intrínseca a través del IFN- γ R en LiB y en LiT para la generación de LiB de CG y Tfh, respectivamente. IFN- γ se sinergiza con señales coestimuladoras para promover la expresión intrínseca en LiB y en LiT CD4⁺ del regulador maestro de CGs, Bcl-6^{163, 168}.

INTRODUCCIÓN

Tercera Parte

GALECTINAS COMO PROTEÍNAS MODULADORAS DE PROCESOS INMUNOLÓGICOS

Rol de Galectina-3 en el Sistema Inmune

3.1. Rol de las galectinas (especialmente Galectina-) en el Sistema Inmune.

Las galectinas, una familia de proteínas unidoras de glicanos, están involucradas en prácticamente todos los procesos del sistema inmune ²⁰³: desde mantener a las células pre-B en un nicho de desarrollo en el estroma de la médula ósea ²⁰⁴, regular la fuerza de la señalización del TCR durante la selección de timocitos ²⁰⁵, promover o retrasar la migración de neutrófilos, monocitos y células dendríticas a través del endotelio y a través de la matriz extracelular ^{206, 207}, controlar la secreción de citoquinas y la señalización de los correspondientes receptores ^{208, 209}, mejorar o bloquear el reconocimiento de patógenos y su unión a células hospedadoras ²¹⁰, hasta activar o inhibir la muerte de LiB y LiT ²¹¹.

Según su estructura, las galectinas se clasifican en tres familias diferentes: (a) galectinas 'proto-tipo' (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15) las cuales contienen un único dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que puede dimerizarse; (b) galectinas en "repetición en tándem" (galectina-4, 6, 8, 9 y 12) que contienen dos CRD homólogos en tándem; y (c) galectina-3 "tipo quimera", que muestra de forma única un CRD conectado a una región N-terminal no lectina responsable de la oligomerización ²¹².

Galectina-1 (Gal-1) fue la primer galectina identificada ²¹³. El grupo del Dr Rabinovich ha llevado a cabo una extensa e importante labor dilucidando la influencia de Gal-1 en múltiples escenarios de respuesta inmune: tumores y angiogénesis, autoinmidades, alergias e infecciones ^{212, 213, 214, 215, 216}. Gal-1 emerge como una potente señal homeostática que, junto a otros mediadores antiinflamatorios, controla la inflamación y limita la inmunopatología a la vez que dificulta las respuestas antimicrobianas y antitumorales. Los mecanismos que subyacen a estos efectos van desde la modulación de la polarización de los macrófagos, la inhibición del tráfico de eosinófilos y neutrófilos, la inducción de DC tolerogénicas y otras poblaciones mieloides regulatorias, la expansión de Tregs, la inhibición de células NK y la modulación de la función de las células T controlando la síntesis de citocinas ^{213, 214, 215, 216}. Debido a sus actividades inmunosupresoras y proangiogénicas ²¹⁷, las interacciones llevadas a cabo por galectinas han surgido como un enfoque terapéutico prometedor, tanto como monoterapia o en combinación con otros tratamientos.

Particularmente, Galectin-3 (Gal-3) es una proteína de unión a β -galactósidos que regula interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular afectando diferentes procesos tales como la proliferación celular, la migración, la adhesión, la diferenciación y la apoptosis ²¹⁸. Gal-3 tiene

una amplia distribución entre diferentes tipos de células, entre las que se destacan macrófagos, monocitos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, células NK, LiT y LiB ^{219, 220} (Fig. 4).

Gal-3 modula la expresión de varios genes reguladores y forma redes ("lattices") con receptores de glicoproteína de superficie y detecta glicoconjugados propios o de patógenos cuando se localiza en superficies celulares ²²¹. Gal-3 es capaz de reconocer carbohidratos tanto endógenos como exógenos provocando complejas respuestas inmunes y autoinmunes ²²². Puede localizarse intracelularmente, en el núcleo y el citoplasma, o extracelularmente, secretada a través de la vía no clásica ²¹². Según su nivel de expresión, el tipo de célula y la condición inmunológica, Gal-3 puede actuar como un regulador positivo o negativo de la respuesta inmune ^{223, 224, 225}.

Gal-3 extracelular induce apoptosis de LiT ²²⁶, aunque Gal-3 intracelular inhibe la apoptosis y la expresión de IL-5, promueve el crecimiento celular y regula negativamente la activación de las células T CD4 mediadas por TCR en las sinapsis inmunológicas ^{227, 228}. En lo que respecta a las subpoblaciones de linfocitos B, Gal-3 regula los nichos de células B220⁺ y CD138⁺ en tejidos linfoides ²²⁹ e inhibe la diferenciación de células plasmáticas in vitro e in vivo en médula ósea, ganglios linfáticos mesentéricos y el bazo ^{220, 229, 230, 231}. Además, Gal-3 desempeña funciones antiapoptóticas en neoplasmas proliferativos de células B ²³² y mantiene la anergia de células B ²³³ (Fig. 4).

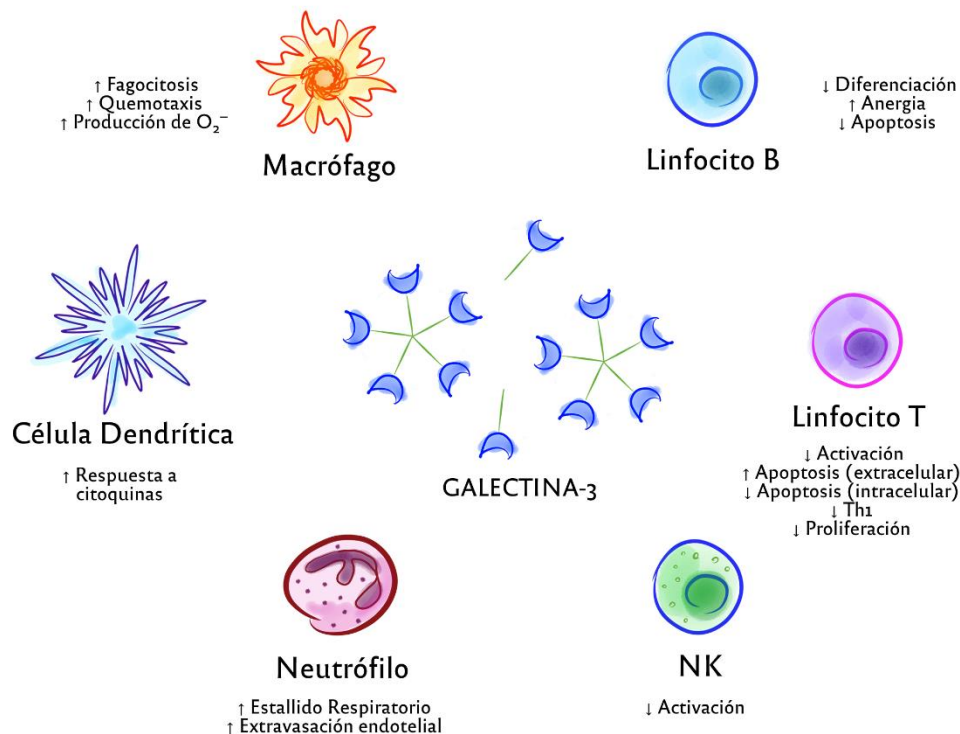


Fig. 4. Principales programas de control mediados por Gal-3 en el sistema inmune.

Representación esquemática de los principales efectos mediados por Gal-3 en el sistema inmune. Gal-3 puede actuar favoreciendo (↑) o inhibiendo (↓) diversos procesos.

ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Ha sido demostrado tanto por nuestro grupo como por otros que una disminución en la expresión de Gal-3, o bien el déficit de la misma, conduce a un aumento en el número de CPs en diversas infecciones ^{220, 229}. Asimismo, también fue probado que la ausencia de Gal-3 promueve la diferenciación de células B1 peritoneales a CPs ²³¹. En nuestro grupo de trabajo determinamos que LiB con expresión reducida de Gal-3 post tratamiento con oligonucleótidos antisentido específicos fueron incapaces de regular negativamente al factor de transcripción Blimp-1 después de la estimulación con IL-4 ²²⁰. A su vez, Hoyer y colaboradores demostraron que Gal-3 está presente en LiB vírgenes e inmaduros pero casi ausente en LiB diferenciados, tales como LiB de CG CD10⁻/IgD⁻ y CP ²³².

Teniendo en cuenta que Gal-3 se expresa en LiB y en LiT y que la disminución en la expresión de Gal-3 mejora la producción de anticuerpos específicos de antígeno en muchos modelos experimentales, nos preguntamos si Gal-3 podría influir en la reacción de CG y en la diferenciación de LiB a CP de origen CG, procesos que implican una delicada comunicación entre las poblaciones de células B y T.

Si bien varios estudios demostraron la influencia de Gal-3 en la respuesta inmune humoral, aún se desconocen los mecanismos por los cuales Gal-3 lo hace. En este contexto y basándonos en resultados de nuestro grupo de trabajo, construimos la hipótesis que forma parte de esta Tesis Doctoral. Postulamos que Gal-3 puede estar involucrada en la respuesta inmune humoral y en particular, en la reacción de CG. La ausencia de Gal-3 en los LiB podría favorecer cierto perfil transcripcional y fenotípico que condicione la inducción de anticuerpos. Nuestros objetivos apuntan a caracterizar en profundidad la respuesta inmune humoral en ausencia de Gal-3, determinar el tipo de anticuerpos generados en estos animales, analizar las moléculas implicadas en la reacción de CG, así como también el perfil transcripcional de los LiB, e identificar los mediadores que Gal-3 podría influenciar para la respuesta de anticuerpos.

De esta manera, los estudios de la relación entre Gal-3 y la respuesta inmune humoral podría ser blanco de nuevas estrategias terapéuticas para patologías asociadas a respuestas inmunes exacerbadas mediadas por anticuerpos y también podría proporcionar un mejor entendimiento de la respuesta de CGs para el desarrollo de vacunas eficientes.

RESULTADOS

Resultados

Gal-3 regula la diferenciación *in-vitro* de LiB

Resultados e investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo y la creciente expansión del estudio de las propiedades modulatorias del sistema inmune ejercido por las galectinas, dieron lugar a formular una serie de preguntas que son objeto de estudio, reflexión y discusión en la presente tesis doctoral. En el grupo de trabajo se documentó previamente que Gal-3 cumple cierto papel en la diferenciación de los LiB²²⁰, ya que cuando en animales infectados con *T. cruzi* se inhibe la expresión de Gal-3, los mismos presentan mayor título de anticuerpos específicos para el parásito y una mayor frecuencia de CP.

Con el objetivo de investigar la expresión de Gal-3 en LiB diferenciados a CP, LiB esplénicos de ratones WT se estimularon con LPS o anti-CD40 + IL-4 para inducir su diferenciación a CP. La figura 5A muestra que Gal-3 fue detectable, por western blot, en LiB esplénicos no estimulados y su expresión decrece pronunciadamente hasta volverse indetectable (condición con LPS) o a niveles muy bajos (condición anti-CD40 + IL-4) luego de 72h post cultivo (Fig. 5A). Para definir la cinética y el patrón de expresión de Gal-3 post-estímulo, LiB fueron cultivados con LPS durante diferentes tiempos. En la Fig. 5B se puede observar que mientras los niveles de expresión de Gal-3 aumentaron a las 24, 48 y 72h en las células cultivadas sólo con medio, los niveles de Gal-3 se vuelven completamente indetectable luego de las 48h post-estímulo con LPS (Fig. 5B). Como el LPS es un inductor de la diferenciación de LiB a CP^{234, 235, 236, 237, 238}, estos resultados sugieren que la disminución de Gal-3 podría estar asociada a una mayor respuesta inmune humoral. Teniendo en cuenta lo anterior, la expresión de Gal-3 en LiB peritoneales y esplénicos, los cuales poseen diferentes habilidades en relación con su capacidad secretante de Acs, fue comparada por western blot. No obstante, no fueron observadas diferencias en la expresión de Gal-3 entre estos dos subtipos de LiB (Fig. 5C). Gal-3 fue detectada también en LiT, aunque con menor nivel de expresión que en los LiB (Fig. 5C). Así como se ha descrito en trabajos previos para otros tipos celulares^{218, 239}, Gal-3 fue detectada, por inmunofluorescencia, tanto en el núcleo como en el citoplasma de LiB cultivados con medio de cultivo solamente (Fig. 5D). Una pérdida pronunciada de la fluorescencia correspondiente a Gal-3 fue observada cuando los LiB se cultivaron en presencia de LPS (Fig. 5D). Estos hallazgos muestran que la diferenciación de los LiB a CP no está

asociado a una redistribución celular de Gal-3 y sugieren que las señales de diferenciación a CP podrían conducir a una reducción en la síntesis de esta proteína. En este sentido, observamos que la estimulación de LiB con LPS indujo una disminución en los niveles de los transcritos que codifican para Gal-3 (Fig. 5E). Por real-time PCR observamos que los niveles de ARNm que codifican para Gal-3 disminuyeron significativamente ($p < 0.001$, one-way ANOVA) en los LiB luego de 24 y 48h post estímulo con LPS respecto a los niveles de ARNm en las células cultivadas durante 12h (Fig. 5E).

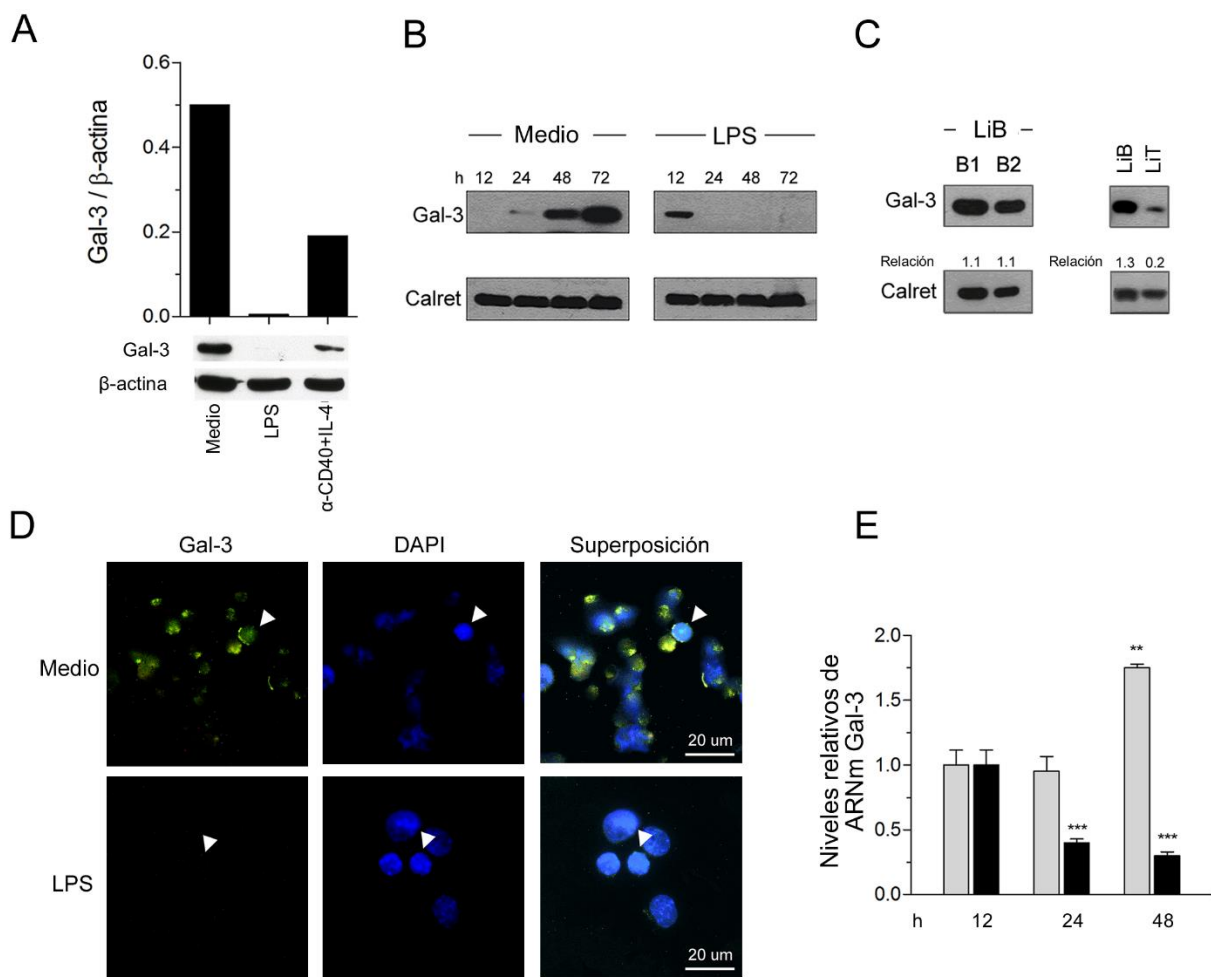


Fig. 5: Disminución de los niveles de Gal-3 durante la diferenciación de LiB a CP.

(A) Niveles de expresión de Gal-3 evaluados por Western Blot en LiB esplénicos cultivados en Medio de cultivo, LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o anti-CD40 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + IL-4 (10 ng/mL) durante 72h. En el gráfico de barras se representa el nivel de expresión de Gal-3 normalizada respecto al nivel de expresión de β -actina (control de carga). (B) Niveles de expresión de Gal-3 evaluados por Western Blot en LiB esplénicos cultivados en Medio o con LPS a diferentes tiempos (12, 24, 48 y 72h) de incubación. Control de carga: calreticulina (Calret). (C) Niveles de expresión de Gal-3 evaluados por Western Blot en LiB peritoneales (B1) y esplénicos (B2) (izquierda), y en LiB y LiT totales esplénicos (derecha) purificados obtenidos *ex vivo*. La señal de Gal-3 fue normalizada al control de carga calreticulina (Calret). (D) Inmunofluorescencia de LiB

esplénicos cultivados con Medio de cultivo (figuras superiores) o LPS (figuras inferiores) durante 72h. Verde: Gal-3, Azul: DAPI. Las flechas indican presencia (figuras superiores) o ausencia (figuras inferiores) de Gal-3. Barras: 20 μ m. (E) Niveles de expresión de ARNm Gal-3 evaluados por RT-PCR en LiB esplénicos cultivados con Medio (barras grises) o LPS (barras negras) durante 12, 24 y 48h de incubación. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. (ANOVA de una vía; comparaciones múltiples Tukey–Kramer). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Gal-3 juega un papel crítico en la formación de Centros Germinales

Para determinar el rol de Gal-3 en la respuesta inmune humoral *in vivo*, ratones deficientes en Gal-3 (Gal-3 KO), entre 8-10 semanas de edad, fueron estudiados. El primer abordaje utilizado para evaluar la respuesta inmune humoral fue determinar los niveles de Igs séricas totales y la frecuencia de ASC, en los ratones Gal-3 KO, teniendo como controles a ratones C57BL/6 normales (WT). Se puede observar en la Fig. 6 que en ausencia de inmunización y/o infección, los ratones Gal-3 KO mostraron, en suero, concentraciones de IgM, IgG2c e IgG3 significativamente ($p < 0.001$, unpaired Student's t-test) más elevadas, (Fig. 6A), así como una mayor frecuencia de ASC de isotipo IgM e IgG tanto en bazo como en médula ósea (MO) (Fig. 6B-C) que los ratones WT.

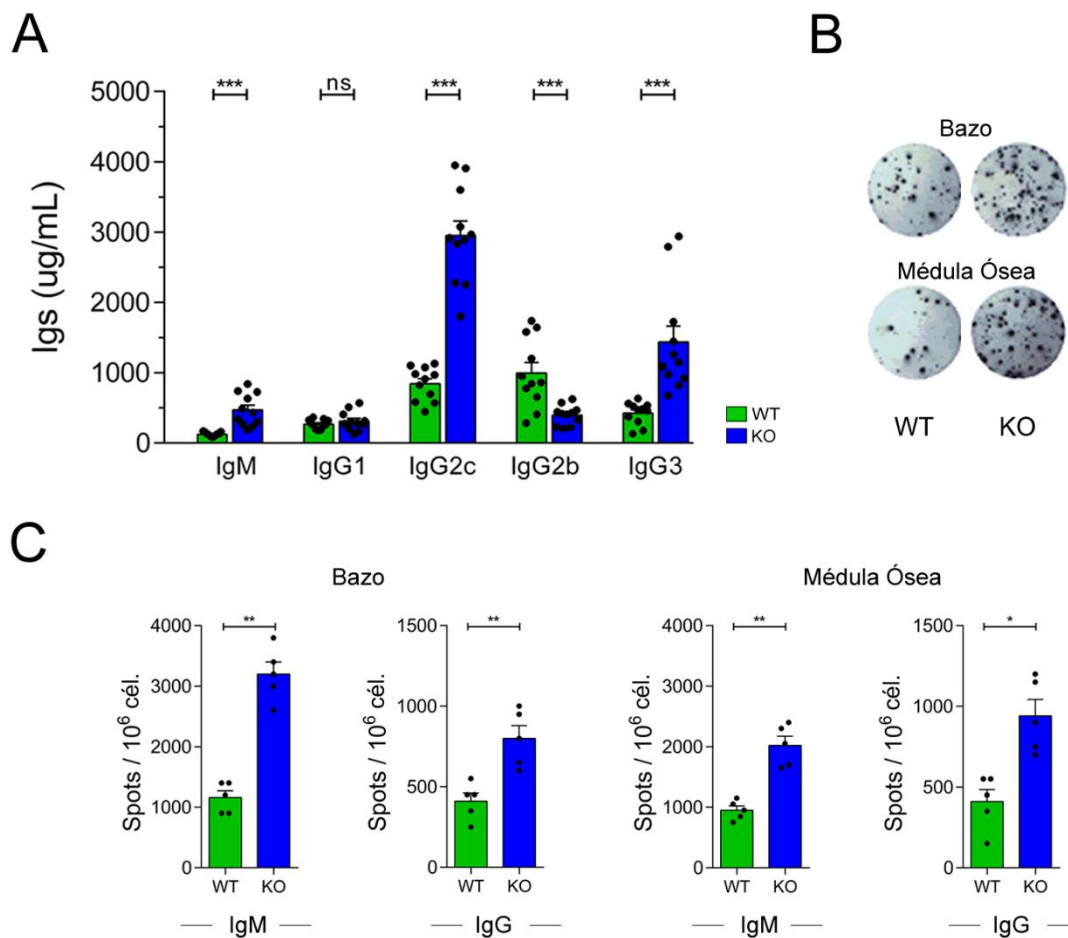


Fig. 6: Los ratones Gal-3 KO presentan hipergammaglobulinemia e incrementado número de ASC.

(A) Niveles de IgM, IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3 en suero de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad medidos por ELISA. (B) Imágenes representativas de ensayos ELISpot mostrando la frecuencia de ASC de isotipo IgM e IgG en bazo y MO de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (C) Análisis estadístico de ensayos ELISpot de ASC de isotipo IgM e IgG en bazo y MO de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que la producción de Acs bajo condiciones homeostáticas puede provenir de diferentes subgrupos de LiB, en el bazo de ratones Gal-3 KO y de WT se estudió la frecuencia de LiB FO, LiB de ZM, LiB de CG y CP. En la Fig. 7A se puede observar que el número absoluto de LiB FO y de ZM fue similar entre ambos grupos de ratones. Llamativamente observamos que los ratones Gal-3 KO tuvieron un número significativamente elevado ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, unpaired Student's t-test, respectivamente) de LiB con fenotipo de CG ($B220^+ FAS^+ GL7^+ CD3^- CD11b^- CD11c^-$) y de CP ($B220^{int} CD138^+ CD3^-$) (Fig. 7B-C), en comparación con ratones WT.

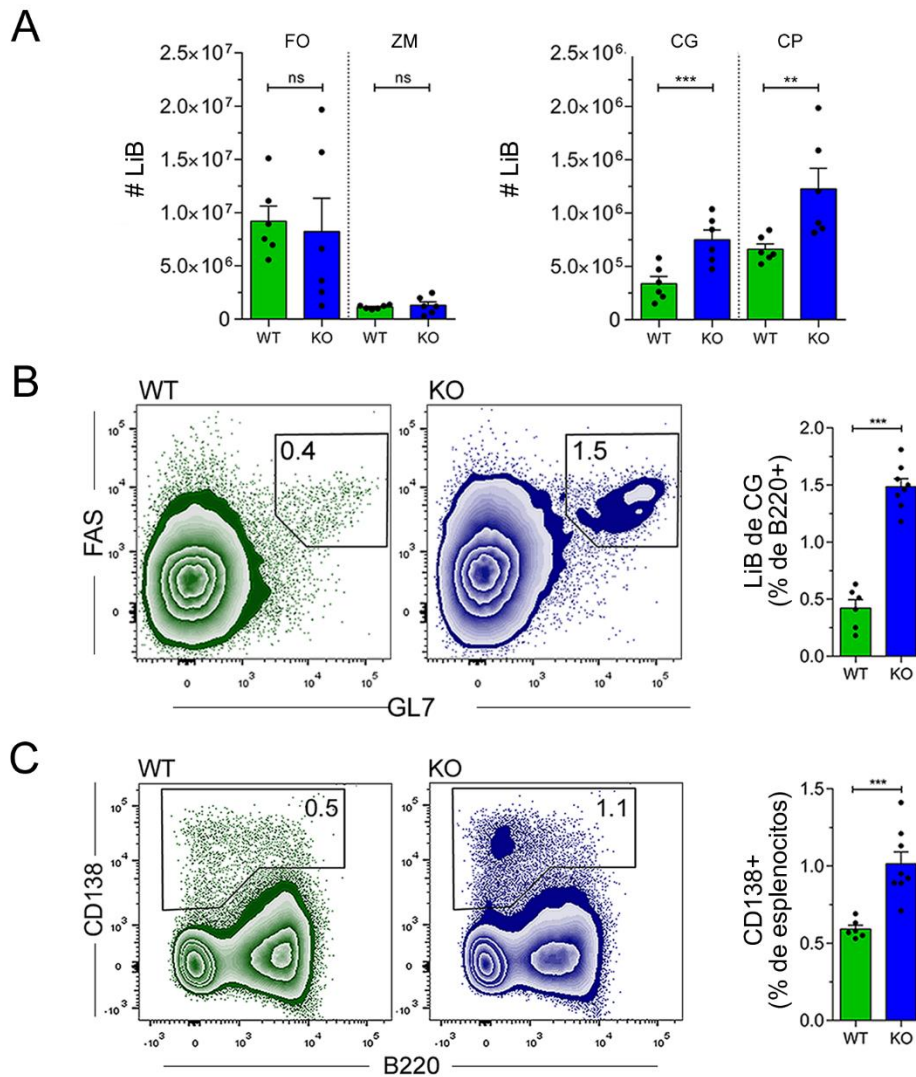


Fig. 7: Los ratones Gal-3 KO generan CGs de forma espontánea.

(A) Números absolutos de LiB de zona marginal ($B220^+ CD21^{high} CD23^- CD3^-$), LiB foliculares ($B220^+ CD21^{int} CD23^+ CD3^-$), LiB de centro germinal ($B220^+ FAS^+ GL7^+ CD3^- CD11b^- CD11c^-$) y células plasmáticas ($B220^{int} CD138^+ CD3^-$). (B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de CP en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras verdes representan ratones WT, Barras azules representan ratones Gal-3 KO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

El fenotipo de los LiB de CG fue confirmado por citometría de flujo; los LiB identificados en la Fig. 7B como $B220^+ Fas^+ GL7^+$ expresaron bajos niveles de IgD y CD38 (Fig. 8A-C) y altos niveles de CXCR4 y CD40 (Fig. 8D-E). Asimismo, dentro de la población de LiB $B220^+ Fas^+ GL7^+$ se observó que existía una elevada frecuencia de células positivas para Ki-67 (marcador de

proliferación celular), a diferencia de la población de LiB no CG ($B220^+ FAS^- GL7^-$) que mostró baja frecuencia de células positivas para Ki-67 (Fig. 8F).

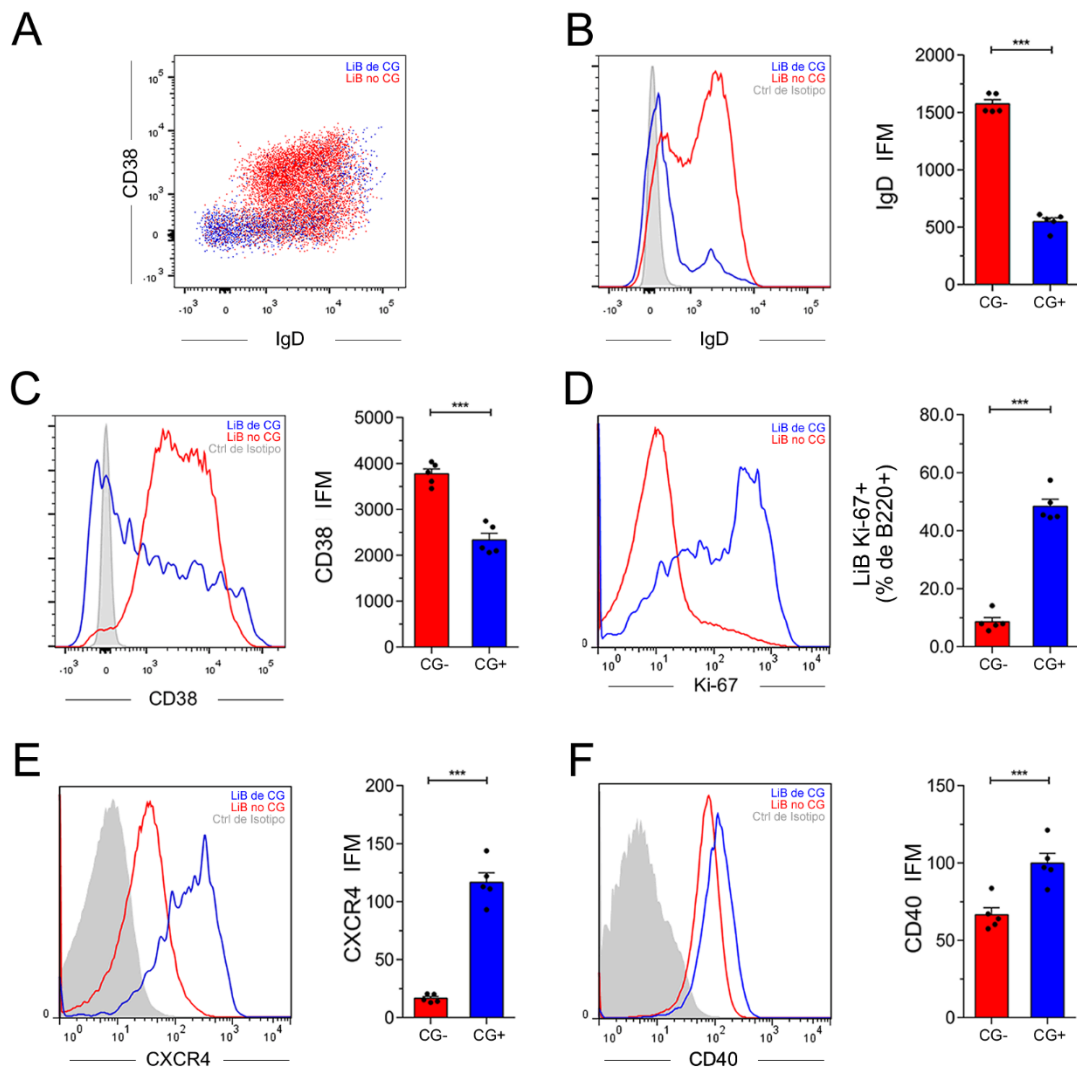


Fig. 8: Caracterización fenotípica de LiB de CG en ratones Gal-3 KO.

(A) Gráficos de densidad de puntos de la expresión de IgD y CD 38. En azul se indican las células con fenotipo de CG ($B220^+ GL7^+ FAS^+ CD4^-$) y en rojo aquellas con fenotipo no CG ($B220^+ GL7^- FAS^- CD4^-$), (B-F) Histogramas y análisis estadístico de la expresión, expresada como intensidad de fluorescencia media (IFM) de IgD (B), CD38 (C), Ki-67 (D), CXCR4 (E) y CD40 (F) en LiB de CG y en LiB no CG de bazo de ratones Gal-3 KO con 8 semanas de edad. Barras rojas representan LiB de CG (CG+), Barras azules representan LiB no CG (CG-). Los histogramas en color gris indican el control de isotipo para cada tinción en particular. *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Si bien los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron que los ratones deficientes en Gal-3 presentan una clara población de LiB con fenotipo de CG, fue necesario comprobar si esta subpoblación de LiB se encontraba dispuesta espacialmente en una arquitectura organizada y definida, dentro de los folículos linfoides. Para ello se efectuaron inmunofluorescencias de cortes de bazo de ambos grupos de ratones. En cortes de bazo de ratones Gal-3 KO no infectados ni inmunizados, pudimos observar grandes estructuras de células PNA positivas (verde), de arquitectura típica conservada dentro de los folículos de LiB (rojo) identificadas claramente como CG (Fig. 9, imágenes a la derecha). En la Fig. 9 (imágenes a la izquierda) se observan, en los cortes de bazo de los ratones WT, folículos de LiB rodeados de LiT, con una ausencia completa de CG (Fig. 9).

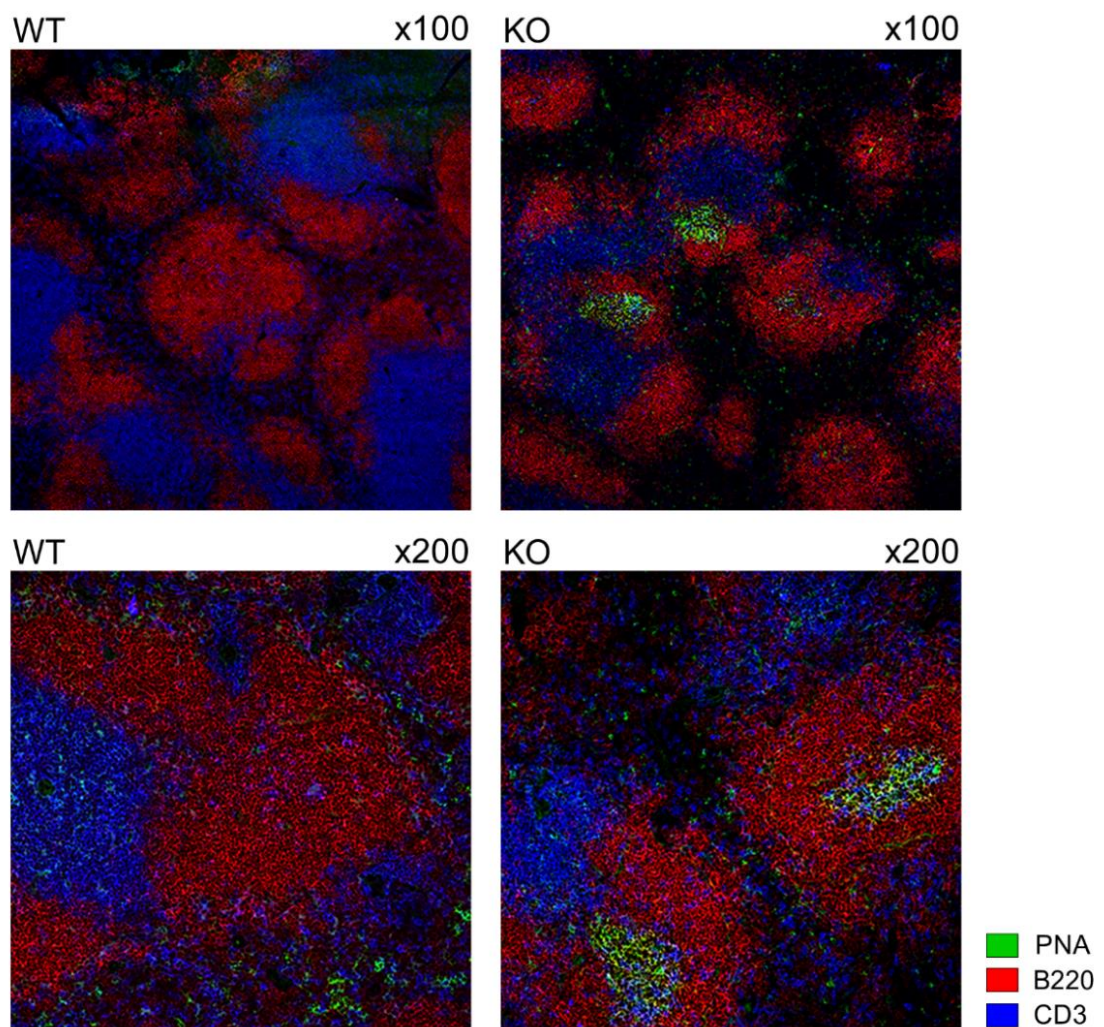


Fig. 9: Los ratones Gal-3 KO generan en forma espontánea CGs con una arquitectura organizada y definida.

Inmunofluorescencia de secciones de bazo congelados de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad, teñidas con PNA (verde), anti-B220 (rojo) y anti-CD3 (azul). Magnificación: x100 (imágenes superiores), x200 (imágenes inferiores).

Un aspecto fundamental en la configuración de una respuesta inmune adaptativa humoral eficiente es la existencia de cooperación entre LiT y LiB, la cual permite, entre otras cosas, la generación de memoria inmunológica y la producción de Acs altamente específicos. Los Tfh son LiT CD4⁺ especializados en proveer cooperación a los LiB^{10, 40, 97, 98}. Al analizar este subtipo de LiT CD4⁺, identificados como CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻, se pudo observar que los ratones Gal-3 KO exhibían una frecuencia y número absoluto significativamente mayor ($p < 0.001$, unpaired Student's t-test) de Tfh, en claro contraste con el reducido número observado en los animales WT (Fig. 10A). Observamos que los Tfh expresaban altos niveles de Bcl-6 y PD-1, confirmando que, efectivamente estas células se corresponden con el linaje Tfh y no con otra población de LiT CD4⁺ (Fig. 10B-C).

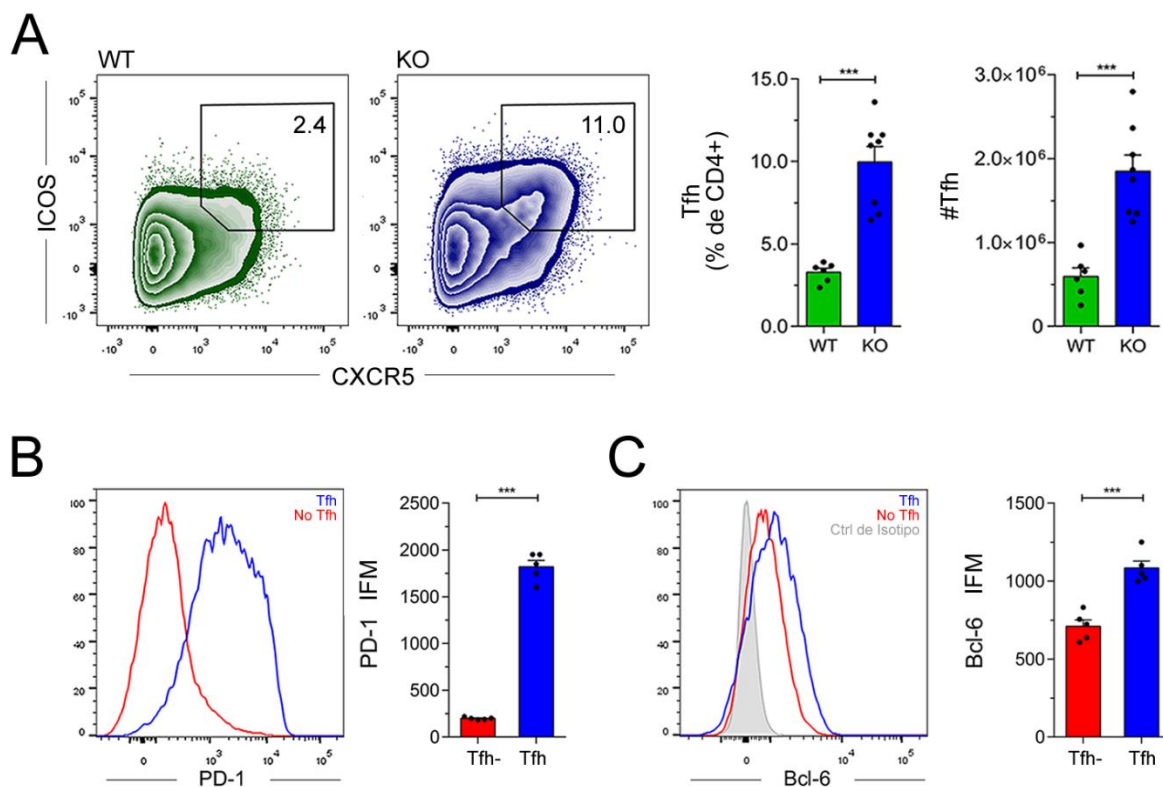


Fig. 10: Los ratones Gal-3 KO desarrollan Tfh bonafide.

(A) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia y número absoluto de Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻) en bazo de ratones WT (barras verdes) y Gal-3 KO (barras azules) de 8 semanas de edad. (B) Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de PD-1 en Tfh (CD4⁺

CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻) y en LiTCD4⁺ no Tfh (CD4⁺ CXCR5⁻ ICOS⁻ Foxp3⁻ B220⁻) en bazo de ratones Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras rojas representan LiT no Tfh; barras azules representan Tfh. (C) Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de Bcl-6 en Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻) y en LiT no Tfh (CD4⁺ CXCR5⁻ ICOS⁻ Foxp3⁻ B220⁻) en bazo de ratones Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras rojas representan LiT no Tfh; barras azules representan Tfh. ***p < 0.001. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados en A, Student's t-test para datos apareados en B). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Por otra parte, se observó que dentro de la población de LiT CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺, la frecuencia de Li Tfr, encargados de controlar principalmente la magnitud de la respuesta inmune humoral, se encontraba reducida en los ratones Gal-3 KO en comparación con los WT (Fig. 11A). No obstante, el número total de Tregs (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺) así como su frecuencia fueron similares en ambos grupos experimentales (Fig. 11B). Analizando características fenotípicas de Tregs se observó que los niveles de expresión de las moléculas regulatorias CTLA-4 y CD39 fueron similares en los Tregs de ambos grupos de ratones (Fig. 11C). A partir del análisis de la frecuencia de Tfh y Tfr se calculó la relación numérica que existe entre ellos. El coeficiente obtenido es un factor que indica la magnitud de la respuesta inmune humoral y alteraciones en esta relación fueron evidenciadas en patologías autoinmunes ^{240, 241} y en respuestas humorales ineficientes frente a patógenos ²⁴². Los ratones Gal-3 KO poseen una relación Tfh/Tfr superior a la de los ratones WT, debido a que la frecuencia de células Tfh responsables de sostener a los CG, se encuentra por encima de la frecuencia de las células responsables de controlar la reacción de CG, denotando que, posiblemente, el compartimento humoral se encuentre alterado.

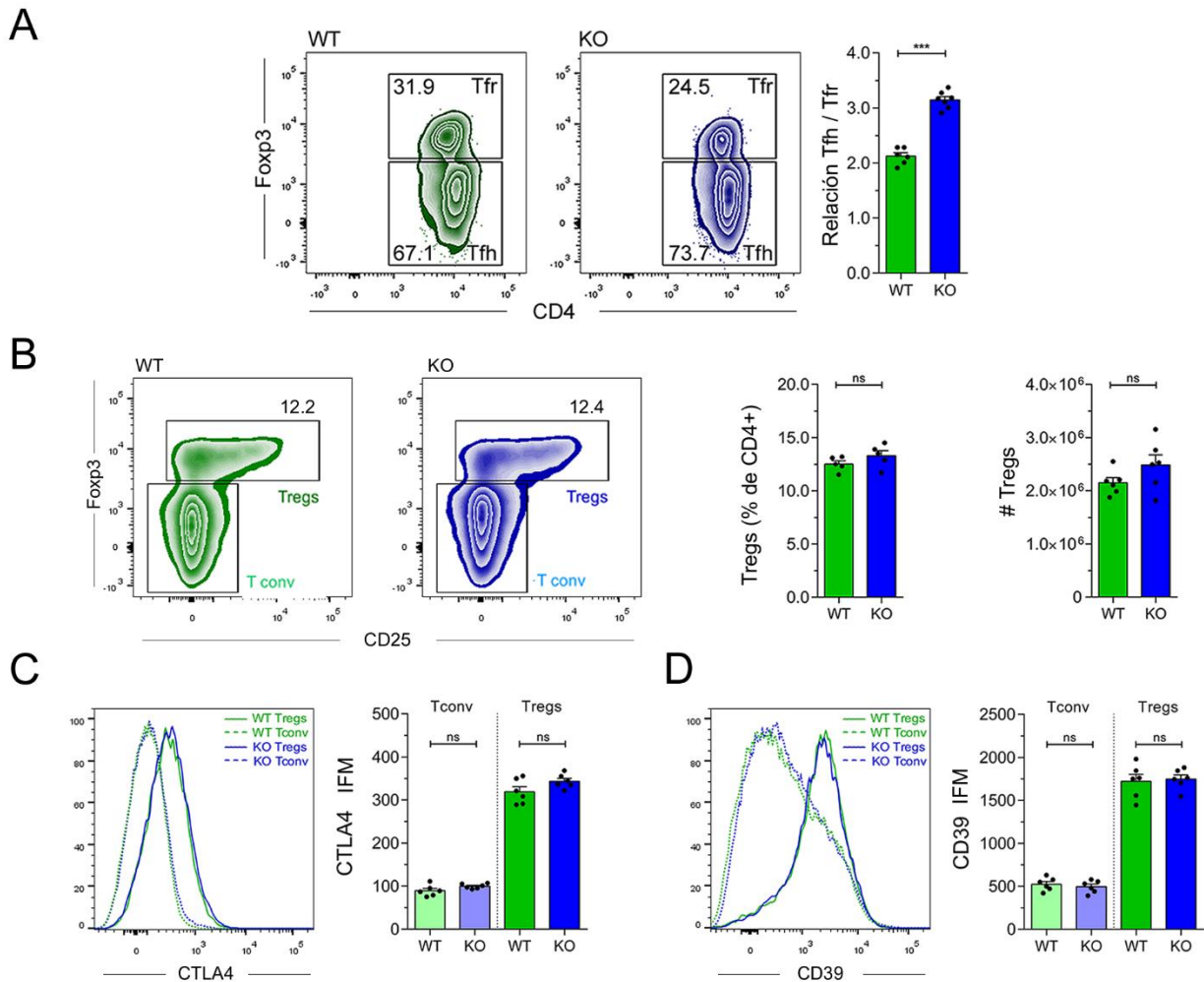


Fig. 11: Los ratones Gal-3 KO no presentan alteraciones en el número de Tregs ni en los niveles de expresión de CTLA4 y CD39.

(A) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la relación Tfh/Tfr (Tfh: CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻; Tfr: CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁺ B220⁻) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia y número absoluto de Tregs en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (C) Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de CTLA4 en LiT regulatorios (Tregs, CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺) y en LiT convencionales (Tconv, CD4⁺ Foxp3⁻ CD25⁻) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (D) Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de CD39 en LiT regulatorios (Tregs, CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺) y en LiT convencionales (Tconv, CD4⁺ Foxp3⁻ CD25⁻) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras verdes representan ratones WT, Barras azules representan ratones Gal-3 KO. ***p < 0.001. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

En su conjunto, estos resultados indican que la ausencia de Gal-3 conduce a la generación espontánea de CGs y, consecuentemente, a la producción de Igs.

Los LiB de ratones Gal-3 KO evidencian un perfil transcripcional y fenotípico asociado a la reacción de CG

Con el propósito de conocer el perfil transcripcional de los LiB que carecen de Gal-3, se efectuó un análisis de los perfiles de expresión génica mediante microarrays en LiB purificados de bazo de ratones Gal-3 KO los cuales fueron comparados con LiB purificados de ratones WT (Fig. 12). De este análisis se pudieron identificar 1796 genes con expresión diferencial entre los LiB de ambos grupos de ratones. El mapa de calor presentado en la Fig. 12 destaca aquellos transcritos de genes más relevantes en la biología de los CGs y que muestran mayores diferencias en su expresión (*fold change* > 1,5) entre los LiB de ambos grupos de ratones (Fig. 12). Se observa que los LiB de los ratones Gal-3 muestran incrementados niveles de transcritos que codifican para Igs y también para moléculas asociadas a un fenotipo y funcionalidad de CG, tales como *Gcet2*, *H2B*, *Mki67* y *Aicda* (clave para el switch de isotipo e hipermutación somática). Acorde a la formación espontánea de CGs, el análisis de microarrays demostró sobreexpresión de dos genes que codifican para microARNs (miRs) fundamentales en la reacción de CG: *miR-155* y *miR-217*. A su vez, la ausencia de Gal-3 en los LiB resulta en una disminución en la expresión del gen que codifica para *miR181b-1*, siendo que su disminución también está asociada a la generación de una respuesta de CG y lupus. Además, en los LiB de los ratones Gal-3 KO se evidenciaron incrementos en los niveles de numerosos miRs, sin función determinada hasta el momento.

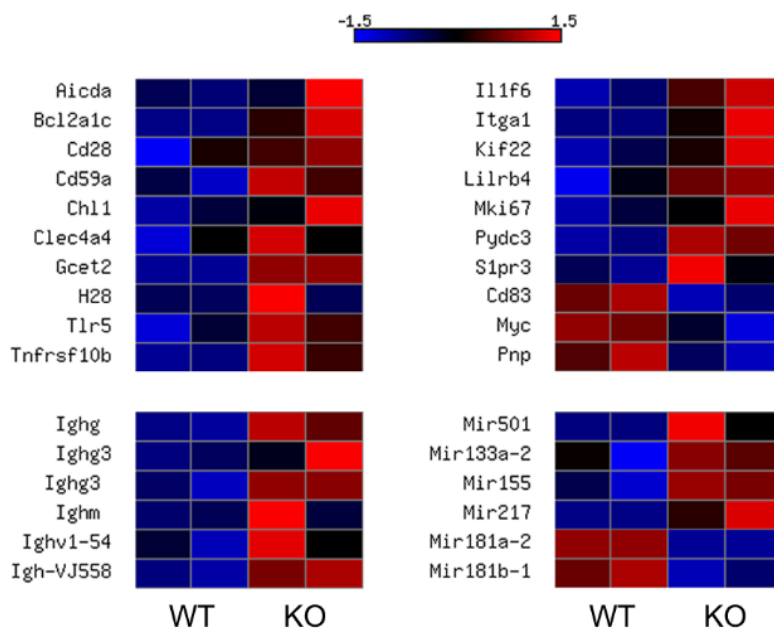


Fig. 12: Los LiB de ratones Gal-3 KO muestran incrementada expresión de genes asociados a la formación de CGs.

Mapa de calor de la expresión de genes relacionados a la reacción de CG determinados en LiB purificados de ratones WT y Gal-3 KO (n=2).

Para obtener más información sobre el impacto general de la ausencia de la señalización provista por Gal-3 en los LiB, se determinó la expresión de marcadores involucrados en la reacción de CG por citometría de flujo. Se observó que IL-21R, un receptor de citoquina clave involucrado en la señalización que conduce al aumento de la expresión del factor de transcripción Bcl-6 y por consiguiente favorece la respuesta de CG, se encontraba expresado en una frecuencia mayor de LiB de los ratones Gal-3 KO, en comparación a su contraparte en los WT (Fig. 13A-B). También se evidenció una mayor frecuencia de LiB positivos para CD80 y CD86 en los ratones Gal-3 KO en comparación al grupo control (Fig. 13A-B), moléculas co-estimuladoras fundamentales que median la activación de un LiB. Además, el análisis de moléculas indicativas de activación celular y proliferación tales como CD69 y Ki-67, respectivamente, mostró que los ratones Gal-3 KO presentaron una mayor frecuencia de LiB positivos para cada una de estas moléculas (Fig. 13A-B). En la Fig. 13B, se presenta un gráfico radar que resume el fenotipo de los LiB en los bazo de los ratones WT y Gal-3 KO (Fig. 13B). En esta imagen claramente puede observarse que en los ratones Gal-3 KO hay una mayor frecuencia de LiB que exhiben un fenotipo que involucra un conjunto de moléculas asociadas a la formación de CGs.

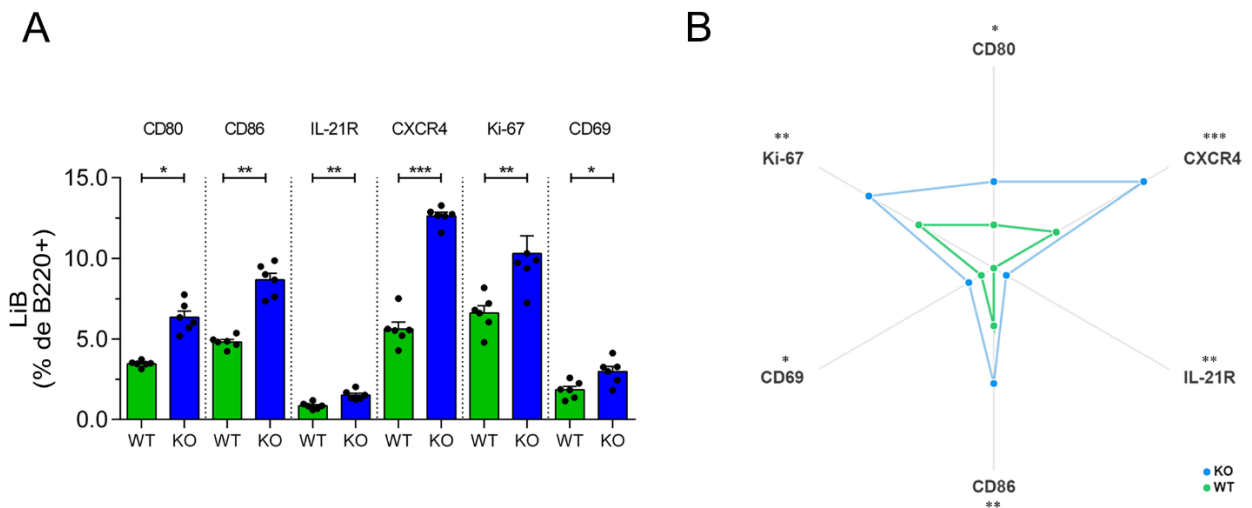


Fig. 13: Los LiB de ratones Gal-3 KO tienen incrementada expresión de moléculas asociadas a activación, coestimulación y proliferación.

(A) Análisis estadístico de la frecuencia de LiB CD80⁺, LiB CD86⁺, LiB IL-21R⁺, LiB CXCR4⁺, LiB Ki-67⁺ y LiB CD69⁺ de bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. (B) Gráfico radar resumiendo el fenotipo observado en LiB de bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

La expresión de genes y de moléculas de superficie que puede observarse en los LiB de los ratones Gal-3 KO remarcan que la ausencia de Gal-3 favorece un fenotipo de activación que propensa a los mismos a diferenciarse a LiB de CG.

La ausencia de Gal-3 en los LiB es suficiente para desencadenar la generación espontánea de CGs.

Con el objetivo de dilucidar si la deficiencia de Gal-3 en los LiB provoca, en completa ausencia de estimulación antigénica, diferenciación espontánea hacia el fenotipo de CG y la secreción de Igs, se diseñaron ensayos de transferencia adoptiva y animales quimera de MO. Primeramente, se realizaron dos ensayos de transferencia adoptiva en los cuales LiB fueron transferidos a ratones suficientes en Gal-3. Este experimento nos permite discernir si contribuciones del entorno celular por falta de Gal-3 influyen en el proceso de diferenciación. La primera transferencia adoptiva

consistió en transferir LiB esplénicos de ratones WT o Gal-3 KO a ratones receptores μ MT, deficientes en LiB, pero con capacidad para sintetizar Gal-3, siguiendo el esquema mostrado (Fig. 14A, izquierda). Los ratones que fueron transferidos con LiB provenientes de ratones deficientes en Gal-3 presentaron concentraciones de IgG2c e IgG3 más elevadas que los sueros de ratones transferidos con LiB provenientes de ratones WT, a los 15 días post-transferencia (Fig. 14A, derecha). Los ratones μ MT sin transferir presentaron, como se esperaba, niveles indetectables de Igs en suero. En un segundo enfoque, se transfirieron LiB GL7⁻ Fas⁻ (LiB no CG) de ratones WT o Gal-3 KO a receptores CD45.1, suficientes en Gal-3, siguiendo el esquema mostrado (Fig. 14B, izquierda). Se observó que los animales CD45.1 que recibieron LiB con fenotipo de no-CG GL7⁻ Fas⁻ de ratones Gal-3 KO presentaron en suero, a los 15 días post-transferencia celular, concentraciones de IgG2c e IgG3 más altas que los ratones CD45.1 que recibieron LiB GL7⁻ Fas⁻ de ratones WT o que ratones CD45.1 control no transferidos (Fig. 14B, derecha). Para determinar el impacto que provoca la deficiencia de Gal-3 endógena *in vitro* en la capacidad de un LiB para secretar Acs, LiB GL7⁻ Fas⁻ (LiB no CG) suficientes o deficientes en Gal-3 fueron co-cultivados con LiT CD4⁺ GL7⁻ también suficientes o deficientes en Gal-3, en presencia de anti-IgM y anti-CD3 (Fig. 14C). Luego de 6 días de co-cultivo, pudo evidenciarse que los LiB deficientes en Gal-3 secretaron cantidades superiores de IgG2c e IgG3 que las secretadas por los LiB suficientes en Gal-3, independientemente de la presencia de LiT CD4⁺ (suficientes o deficientes en Gal-3). Estos resultados sustentan la idea de que la deficiencia intrínseca de Gal-3 en los LiB promueve la secreción espontánea de Acs y probablemente también favorece la generación de CG.

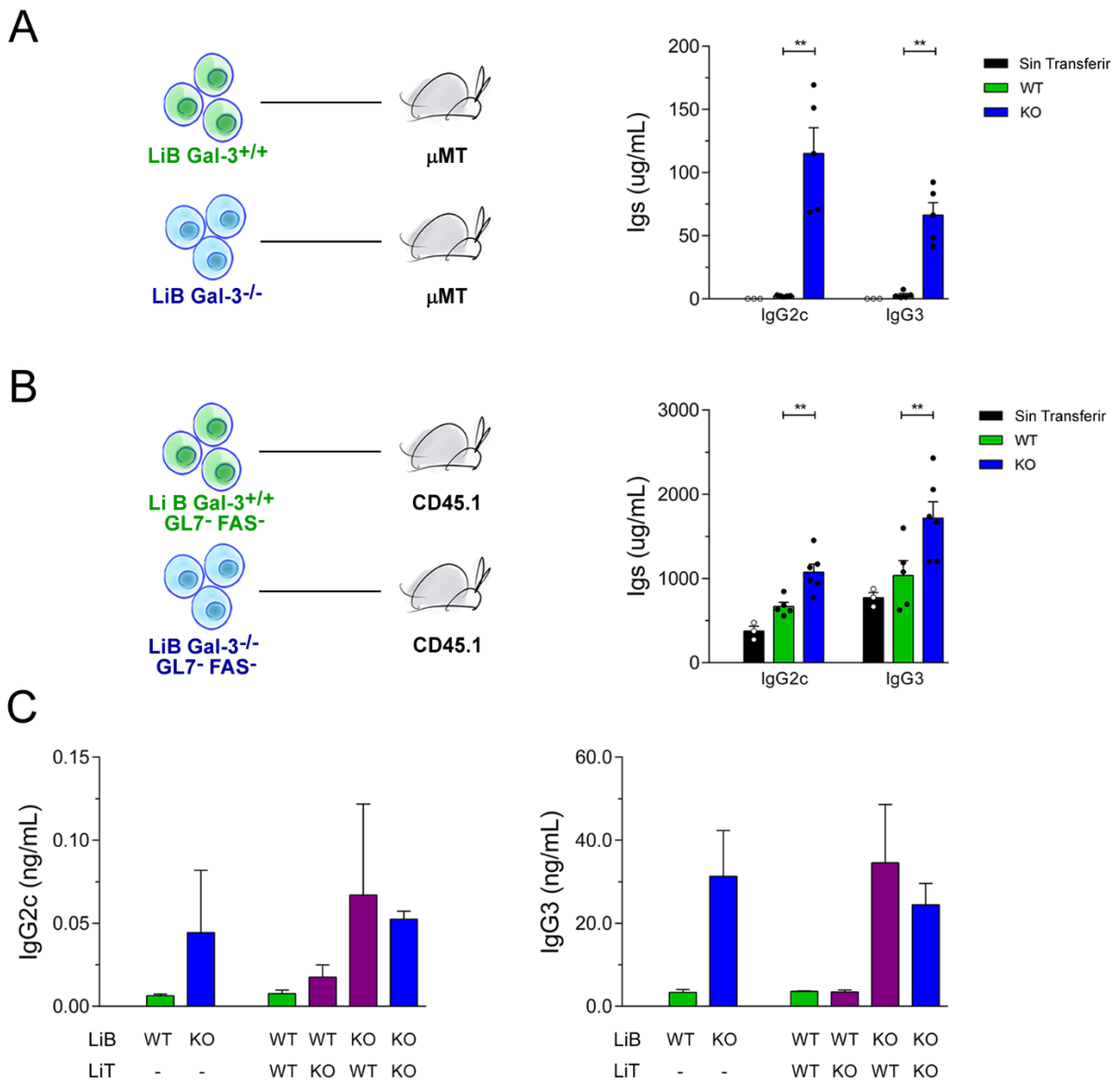


Fig. 14: La deficiencia intrínseca de Gal-3 en los LiB favorece la sobreproducción de Igs.

(A) Esquema representativo de experimentos de transferencia adoptiva en donde se muestra que LiB purificados de ratones WT (LiB Gal-3^{+/+}) y Gal-3 KO (LiB Gal-3^{-/-}) fueron transferidos a ratones μMT. El gráfico de barras muestra las concentraciones de IgG2c e IgG3, determinados por ELISA, en el suero de ratones receptores μMT, 2 semanas posteriores a la transferencia. Las barras verdes y las barras azules indican los valores obtenidos en ratones transferidos con LiB de ratones WT o Gal-3 KO, respectivamente

(B) Esquema representativo de experimentos de transferencia adoptiva en donde se muestra que LiB no CG purificados de ratones WT (LiB Gal-3^{+/+} GL7⁻ FAS⁻) y Gal-3 KO (LiB Gal-3^{-/-} GL7⁻ FAS⁻) fueron transferidos a ratones CD45.1. El gráfico de barras muestra las concentraciones de IgG2c e IgG3 determinados por ELISA en el suero de ratones receptores CD45.1, 2 semanas posteriores a la transferencia. Las barras verdes y las barras azules indican los valores obtenidos en ratones transferidos con LiB no CG obtenidos de ratones WT o Gal-3 KO, respectivamente

(C) Concentraciones de IgG2c e

IgG3 en sobrenadantes de cultivos de LiB (B220⁺ CD4⁻ GL7⁻) co-cultivados con LiT (CD4⁺ B220⁻ GL7⁻), obtenidos por *cell sorting* a partir de bazo de ratones WT y Gal-3 KO, en relación 1:1 y estimulados durante 6 días con anti-CD3 y anti-IgM. Las combinaciones de las distintas poblaciones de LiB y LiT realizadas, se muestran al pie de cada barra. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta la estrecha interdependencia que existe entre LiB de CG y Li Tfh en el establecimiento, mantenimiento y evolución de un CG, se decidió efectuar quimeras de médula ósea (MO). La generación de ratones quimeras es crucial para responder interrogantes inmunológicos claves, ya que permiten determinar los efectos intrínsecos de una molécula sobre una población celular en un entorno biológico compartido e idéntico. En un primer diseño experimental (Fig. 15A), se generaron quimeras de MO en los cuales la ausencia de Gal-3 sólo estuvo limitada a los LiB. Para ello, ratones C57BL/6 receptores fueron irradiados letalmente y reconstituidos posteriormente con un 80% de células de MO de ratones μ MT (deficientes en LiB) y un 20% de células de MO de ratones Gal-3 KO (80% μ MT:20%Gal-3^{-/-}). El grupo control se generó con un 80% de células de MO de ratones μ MT (deficientes en LiB) y un 20% de células de MO de ratones WT (80% μ MT:20%Gal-3^{+/+}). Luego de dos meses post-reconstitución, en las quimeras de MO con ausencia restringida de Gal-3 en los LiB, se pudo observar la presencia espontánea de LiB con fenotipo de CG. Puede observarse con claridad una elevada frecuencia de LiB de CG (B220⁺ Fas⁺ GL7⁺ CD4⁻) y de Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ B220⁻) que fueron generados en los receptores con ausencia de Gal-3 restringida a LiB (80% μ MT:20%Gal-3^{-/-}), en comparación a los animales quimera controles (80% μ MT:20%Gal-3^{+/+}) (Fig. 15B-C). De forma similar a lo evidenciado en los ratones Gal-3 KO, los ratones quimera de MO con ausencia de Gal-3 restringida a LiB (80% μ MT:20%Gal-3^{-/-}) presentaron porcentajes incrementados de células B220⁺ Ki-67⁺ y CD4⁺ Ki-67⁺ que sus contrapartes quimera de MO controles suficientes en Gal-3 (Fig. 15D).

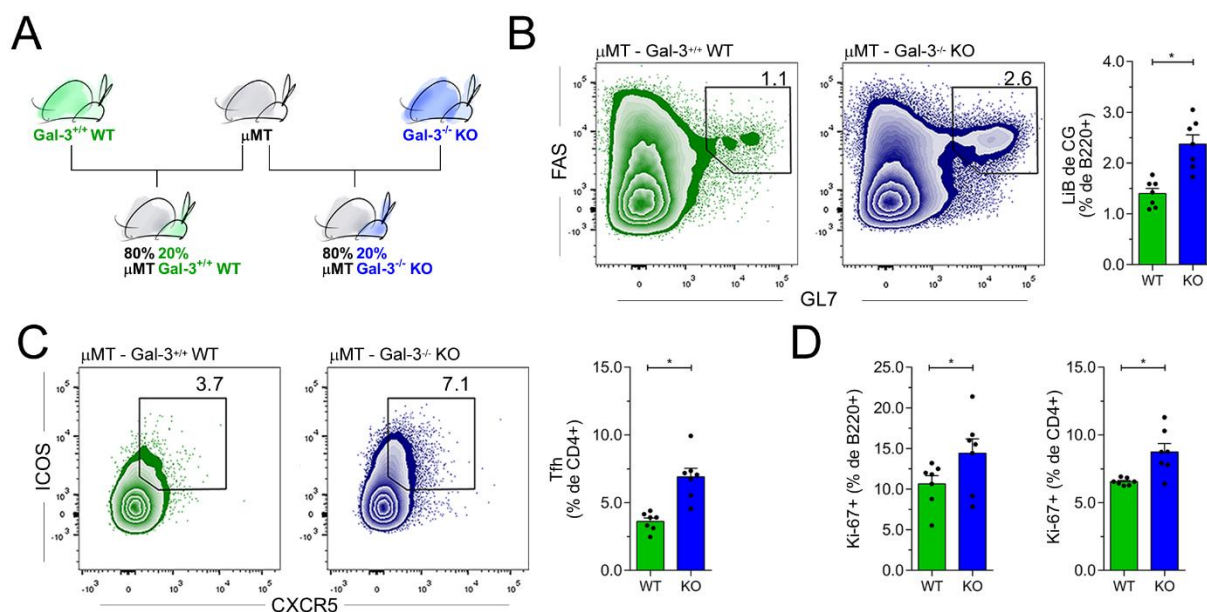


Fig. 15: La deficiencia intrínseca de Gal-3 en los LiB conduce a la generación espontánea de CGs.

(A) Diseño experimental de quimeras conteniendo células de MO en una relación 80:20 provenientes de ratones μ MT y WT (quimeras 80:20 μ MT:Gal-3^{+/+} WT) o células en una relación 80:20 provenientes de ratones μ MT y Gal-3 KO (quimeras 80:20 μ MT:Gal-3^{-/-} KO). (B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG en el bazo de quimeras de MO representadas en la Fig. 15A. (C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de Tfh en bazo de quimeras de MO representadas en la Fig. 15A. (D) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB proliferantes B220⁺ Ki-67⁺ (gráfico izquierdo) y LiT proliferantes CD4⁺ Ki-67⁺ (gráfico derecho) en el bazo de quimeras de MO representadas en la Fig. 15A. Las barras verdes representan animales reconstituidos con células de ratones WT, las barras azules representan células provenientes de ratones Gal-3 KO. *p < 0.05. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Con el objetivo de evaluar la conducta de las células en un mismo entorno celular y molecular, en un segundo diseño experimental (Fig. 16A), se generaron ratones quimera en los cuales células de MO provenientes de ratones deficientes en Gal-3 (identificadas con la isoforma molecular CD45.2) coexistieron con células suficientes en Gal-3 (identificadas con la isoforma molecular CD45.1). Para ello, ratones C57BL/6 receptores fueron irradiados letalmente y reconstituidos posteriormente con un 70% de células de MO Gal-3^{+/+} CD45.1 y un 30% de células de MO Gal-3^{-/-} CD45.1. Este diseño experimental permitió evaluar, en un mismo entorno *in vivo*, si las células deficientes en Gal-3 podrían influenciar la respuesta inmune humoral de células suficientes en Gal-3. Luego de dos meses post-reconstitución, se evaluó la frecuencia de LiB de CG. La figura 16

B y C muestra que la frecuencia de LiB de CG y de Tfh fue significativamente mayor ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente, unpaired Student's t-test) dentro de la población CD45.2 (deficiente en Gal-3) en comparación con la población control CD45.1 (suficiente en Gal-3). También se observó una frecuencia significativamente elevada ($p < 0.001$, unpaired Student's t-test) de Li B220⁺ Ki-67⁺ y CD4⁺ Ki-67⁺ entre la población CD45.2 (deficiente en Gal-3) respecto de la frecuencia determinada en la población control CD45.1 (suficiente en Gal-3).

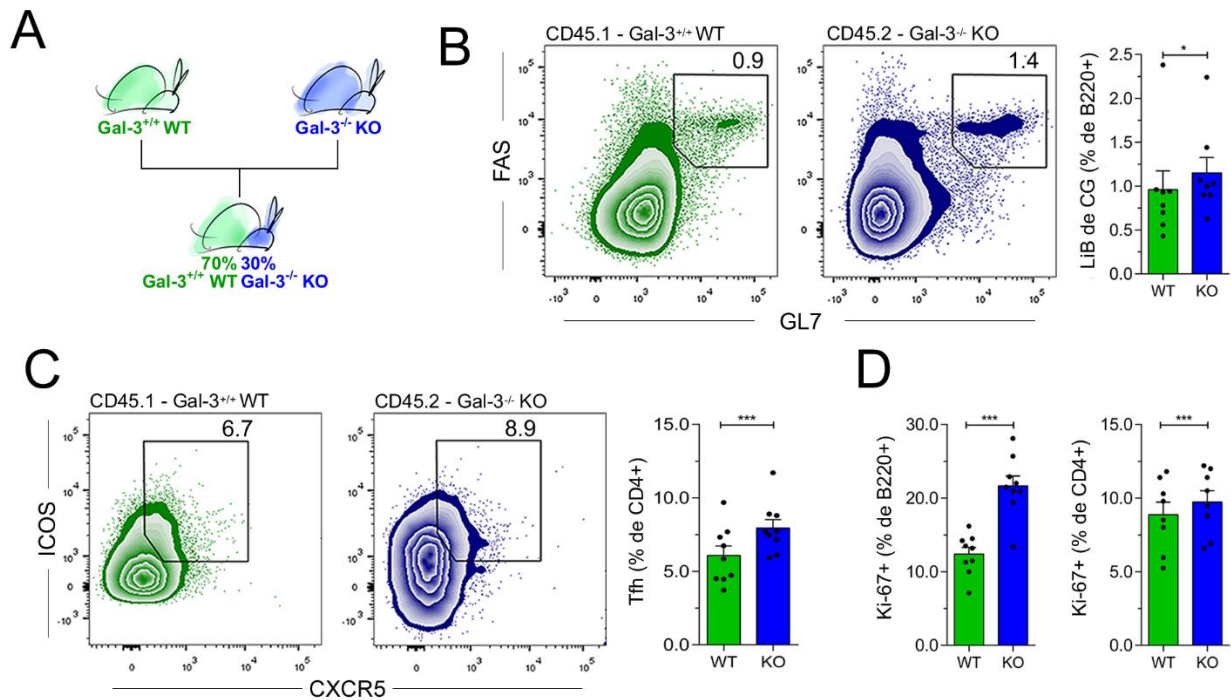


Fig. 16: La ausencia de Gal-3 en células hematopoyéticas no induce la generación de CGs en células Gal-3 suficientes.

(A) Diseño experimental de quimeras generadas con células de MO provenientes de ratones CD45.1 Gal-3^{+/+} WT y CD45.2 Gal-3^{-/-} KO, en una relación 70:30, respectivamente. (B-C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG (B) y de Tfh (C) en bazo de quimeras de MO descritas en la Fig. 16A. (D) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB proliferantes B220⁺ Ki-67⁺ (gráfico izquierdo) y LiT proliferantes CD4⁺ Ki-67⁺ (gráfico derecho) en bazo de quimeras de MO descritas en la Fig. 16A. Barras verdes representan la frecuencia de las células mencionadas en cada gráfico dentro de la población de células CD45.1 Gal-3^{+/+} WT, y las barras azules las de la población CD45.2 Gal-3^{-/-} KO. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos apareados). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Es importante señalar que ambos diseños de ratones quimeras de MO (Fig. 15 y Fig. 16) fueron efectuados en paralelo a controles experimentales (ratones irradiados no transferidos y ratones irradiados transferidos únicamente con células de cada genotipo). Ninguno de los ratones irradiados no transferidos vivió por más de 6 días, indicando que no hubo resurgimiento de la MO propia del ratón receptor post irradiación. Por otra parte, los ratones irradiados repoblados con un único genotipo de células replicaron los comportamientos típicos de los ratones de los cuales estas células provenían.

Los resultados obtenidos, y analizados en conjunto, indican que la deficiencia de Gal-3 en los LiB es suficiente para desencadenar la generación espontánea de CGs, y que las células deficientes en Gal-3 no inducen a las células suficientes en Gal-3 a un fenotipo de CG.

Gal-3 regula la producción de IFN- γ

Ha sido demostrado que la inducción de ciertos isotipos de Igs está íntimamente relacionada con las citoquinas que imperan en el microambiente folicular^{33, 243, 244, 245}. Las citoquinas secretadas por las células que se alojan en los nichos de CGs, especialmente los Tfh, son fundamentales para la inducción, mantenimiento, calidad y magnitud de la respuesta inmune humoral generada, así como también de la diferenciación de los LiB a células plasmáticas y de los LiT a Tfh, incluso de manera autocrina^{33, 40}. Debido a que los ratones Gal-3 KO evidencian una marcada hipergammaglobulinemia, en especial a expensas de elevadas concentraciones de IgG2c e IgG3, se procedió a evaluar la presencia de diferentes citoquinas que pudieran influenciar/condicionar el isotipo de Ac generado en los ratones Gal-3 KO. Se evidenció que Li T CD4⁺ purificados de ratones Gal-3 KO, estimulados con anti-CD3/CD28, fueron capaces de producir cantidades significativamente mayores ($p < 0.01$, unpaired Student's t-test) de IFN- γ , IL-21 e IL-4, y cantidades similares de IL-6 e IL-2 que Li T CD4⁺ provenientes de ratones WT (Fig. 17).

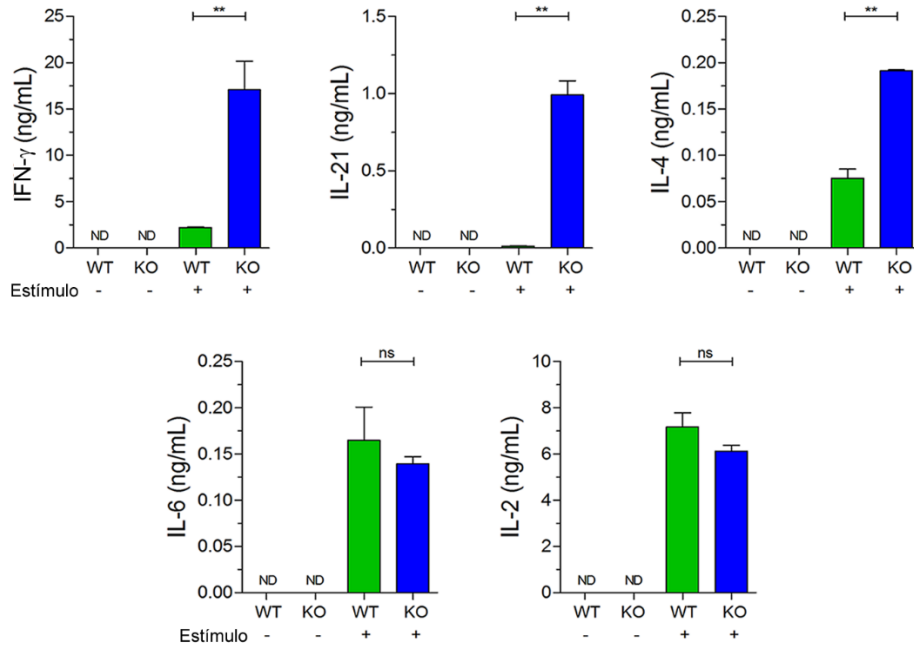


Fig. 17: Los LiT CD4⁺ de ratones Gal-3 KO producen mayores cantidades de citoquinas promotoras de la reacción de CG.

Cuantificación de IFN- γ , IL-21, IL-4, IL-6 e IL-2, por ELISA, en sobrenadantes de cultivos de LiT CD4⁺ purificados de bazo de ratones WT y Gal-3 KO, estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 durante 72h. Barras verdes representan resultados obtenidos con ratones WT, y las barras azules aquellos obtenidos con ratones Gal-3 KO. ** $p < 0.005$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Además, la frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ , determinada por citometría de flujo, fue 2,5 veces superior en los ratones Gal-3 KO que en los WT (Fig. 18A). Los ratones Gal-3 KO también evidenciaron una mayor frecuencia de LiB B220⁺ productores de IFN- γ que ratones WT (Fig. 18B). Como se mencionó anteriormente, el aporte de citoquinas por parte de los Tfh es clave para condicionar el perfil de respuesta humoral. En este sentido, en los ratones Gal-3 KO, se observó una frecuencia de Tfh productoras de IFN- γ significativamente más alta ($p < 0.001$, unpaired Student's t-test) en relación con otras poblaciones de LiT CD4⁺; y a su vez esta población exhibió la tasa de producción de IFN- γ más alta, comparada con Li T CD4⁺ no Tfh y Tfr (Fig. 18C).

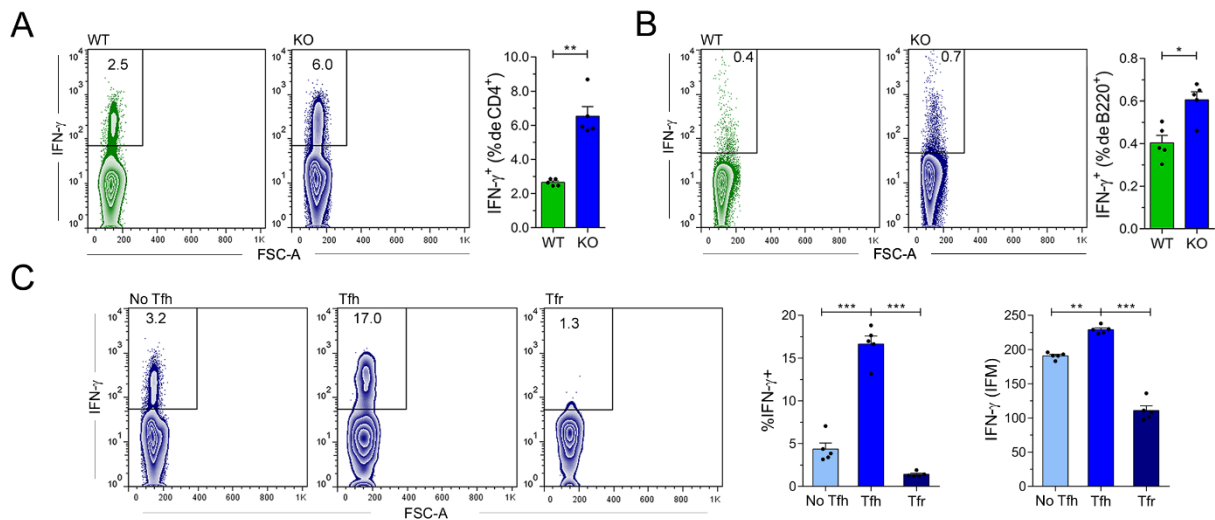


Fig. 18: Los ratones Gal-3 KO exhiben una aumentada producción de IFN- γ .

(A) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB B220⁺ productores de IFN- γ en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. (C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiT no Tfh (CD4⁺ CXCR5⁻ ICOS⁻), Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻) y Tfr (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁺) productores de IFN- γ (izquierda) e Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de IFN- γ (derecha) en las mismas poblaciones señaladas en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Barras verdes representan resultados obtenidos con células provenientes de ratones WT y las barras azules con células provenientes ratones Gal-3 KO. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Con el objetivo de identificar otros tipos celulares, distintos a los LiT CD4⁺, productores de IFN- γ se efectuó un mapeo, por citometría de flujo, de diversas poblaciones celulares del sistema inmune. Se pudo observar que la frecuencia de LiT CD8⁺, DC, NK o NKT productores de IFN- γ fue similar y no hubo diferencias significativas (p > 0.05, unpaired Student's t-test) entre ambos grupos experimentales (Fig. 19A-D).

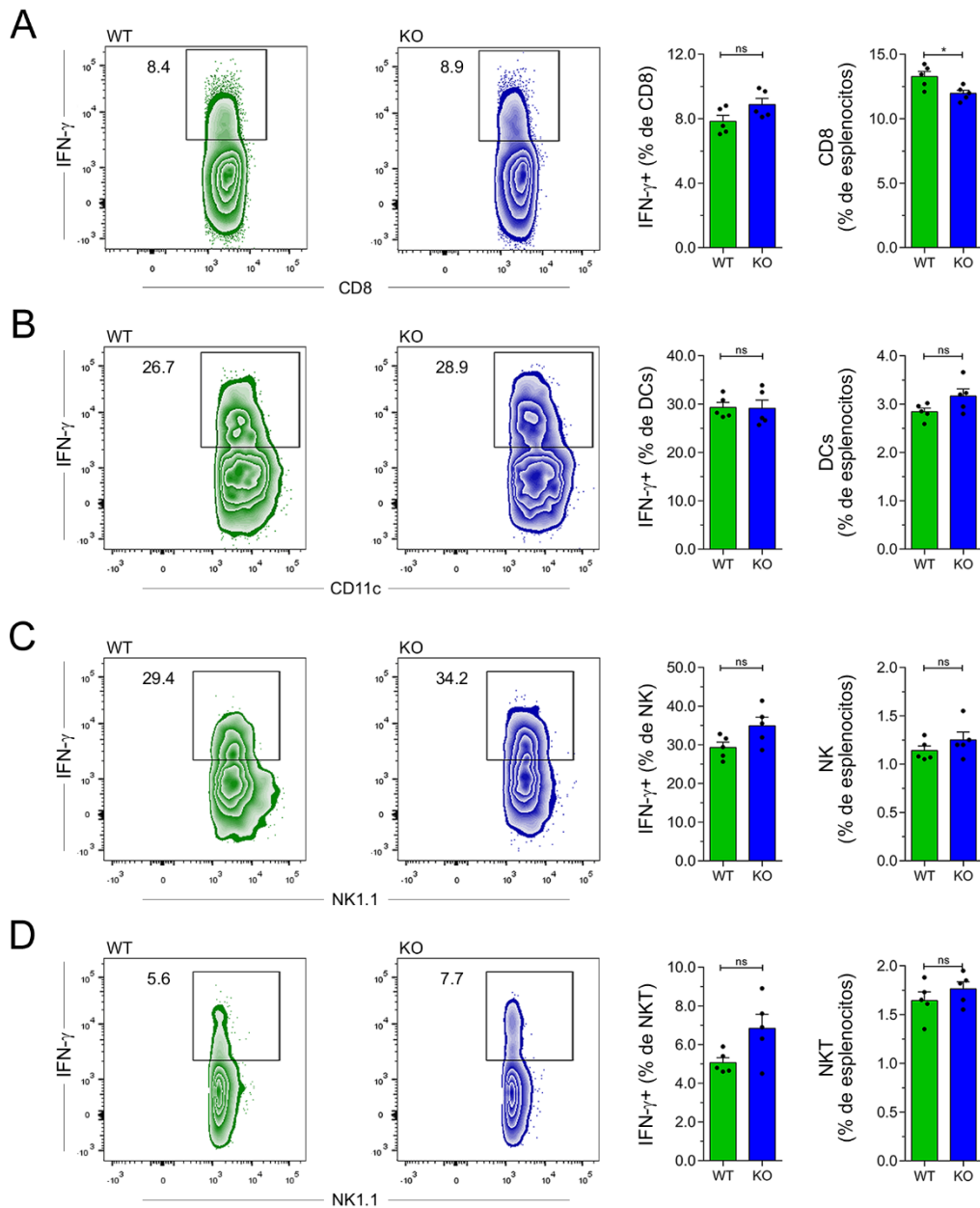


Fig. 19: La frecuencia de células CD8⁺, DC, NK y NKT productoras de IFN- γ en los ratones Gal-3 KO fue similar a la de ratones WT.

(A-D) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiT CD8⁺ (A), DCs convencionales (B), células NK (C) y células NKT (D) productoras de IFN- γ en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad. Las poblaciones celulares se definieron según la expresión de los siguientes marcadores: LiT CD8⁺: CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻; DCs convencionales: CD11c⁺ IA/IE⁺ CD3⁻ CD19⁻; Li NK: NK1.1⁺, CD49b⁺, CD3⁻, TCR β ⁻; Li NKT: NK1.1⁺, CD49b⁺, CD3⁺, TCR β ⁺. Barras verdes representan ratones WT, Barras azules representan ratones Gal-3 KO. *p < 0.05. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Para investigar si la deficiencia intrínseca de Gal-3 en los LiB afectaba a la producción de IFN- γ , en los ratones quimeras de MO descritas anteriormente en la Fig. 15A en las cuales sólo los LiB carecían de Gal-3, se evaluó la frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ por citometría de flujo. En estos animales detectamos un incremento significativo ($p < 0.01$, unpaired Student's t-test) en la frecuencia de Li T CD4⁺ productores de IFN- γ (Fig. 20A). Al igual que lo evidenciado en los ratones Gal-3 KO, las quimeras de MO descritas en el esquema de la Fig. 16A, en la cual convivieron células suficientes en Gal-3 con células deficientes en Gal-3, también mostraron una incrementada frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ entre las células CD45.2 (deficientes en Gal-3) en comparación con las CD45.1 (suficientes en Gal-3) (Fig. 20B). Los datos analizados en conjunto indican que la ausencia selectiva de Gal-3 en los LiB favorece el aumento de células productoras de IFN- γ .

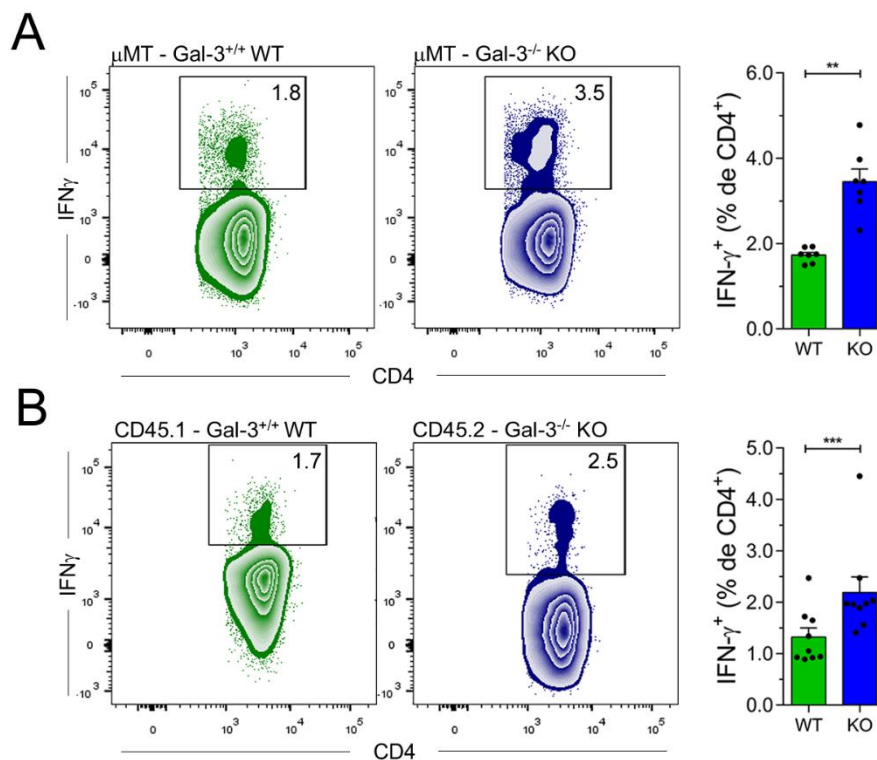


Fig. 20: La deficiencia intrínseca de Gal-3 en los LiB favorece la inducción de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ .

(A) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ en bazo de ratones quimera de MO mostrados en la Fig. 15A, conteniendo células μ MT:Gal-3^{+/+} WT o μ MT:Gal-3^{-/-} KO en una proporción 80:20, diez semanas post-trasplante. (B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ en bazo de ratones quimera de MO mostrados en la Fig. 16A, conteniendo células CD45.1 Gal-3^{+/+} WT: CD45.2 Gal-3^{-/-} KO en una proporción 70:30, diez semanas post-trasplante. Barras verdes representan células provenientes

de ratones WT, barras azules representan células provenientes de ratones Gal-3 KO. **p < 0.005. ns, ***p < 0.001. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados en A, Student's t-test para datos apareados en B). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Estos hallazgos permiten deducir que la vía de señalización ejercida por Gal-3 en los LiB evita la generación espontánea de CGs y también regula la producción de IFN- γ por parte de los LiT CD4⁺.

Para esclarecer el impacto y el efecto que pudiesen tener las altas concentraciones de IFN- γ en los ratones Gal-3 KO, en primera instancia se estudió la expresión del receptor de esta citoquina, IFN- γ R, el cual recientemente fue relacionado con desregulaciones en la respuesta inmune humoral^{162, 163}. En este sentido, se observó que los LiB y LiT CD4⁺ de los ratones Gal-3 KO mostraban mayor expresión de IFN- γ R que sus células contrapartes en los ratones WT. Se observó que los LiB de CG (B220⁺ CD4⁻ FAS⁺ GL7⁺) de ratones Gal-3 KO mostraron mayor expresión de IFN- γ R que los LiB no CG (B220⁺ CD4⁻ FAS⁻ GL7⁻) y que los LiT CD4⁺, tanto de ratones Gal-3 KO como WT (Fig. 21A). Esto permite deducir que serían estas células, los LiB de CG, quienes tienen mayor capacidad de respuesta al IFN- γ . Considerando que IFN- γ juega un papel clave en la inducción de T-bet y es fundamental para el switch de isotipo de IgM a IgG2c e IgG3^{33, 245, 246, 247}, los niveles de expresión de T-bet fueron examinados en los Li de ratones WT y Gal-3 KO. Así como se observó para la expresión de IFN- γ R, los LiB de CG y Tfh expresaron mayores niveles de T-bet que sus contrapartes en los ratones WT (Fig. 21B-C). Esto delimita un panorama en el cual Gal-3, IFN- γ , IFN- γ R y T-bet configuran un mapa de interacciones que condiciona y/o regula la generación de CGs.

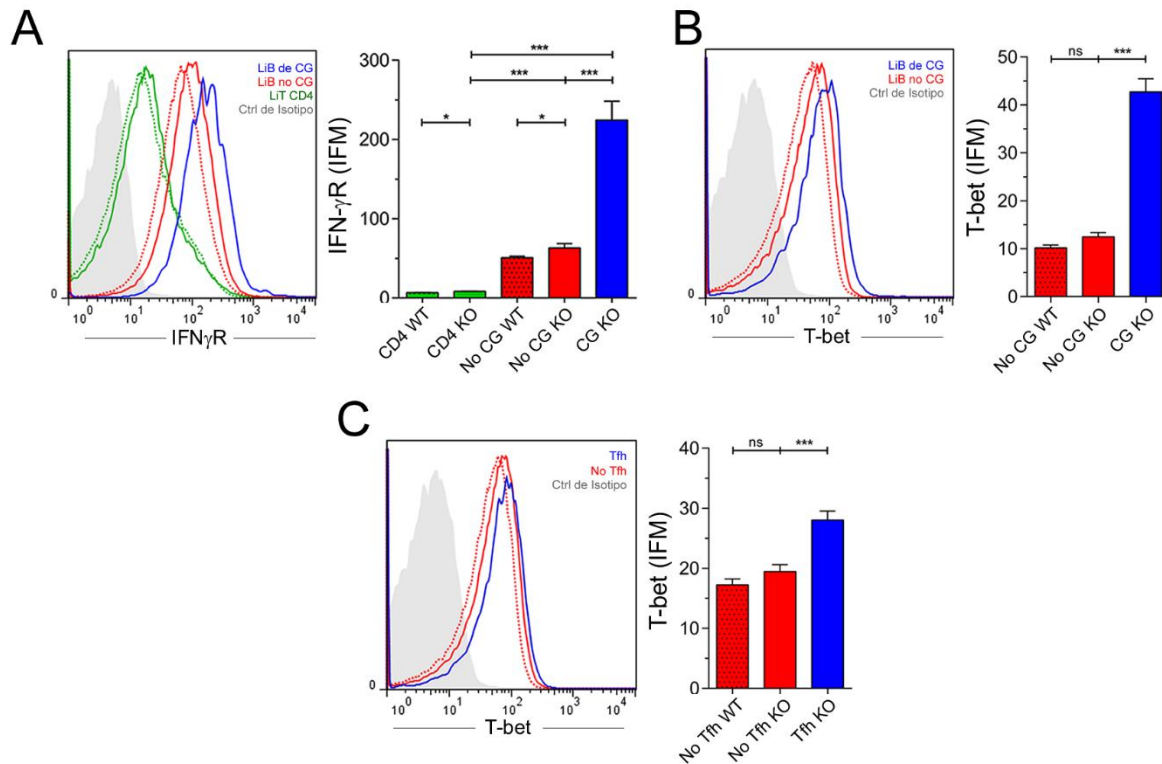


Fig. 21: Los LiB de CG de ratones Gal-3 KO presentaron una incrementada expresión de IFN- γ R y de T-bet.

(A) Histogramas representativos y análisis estadístico de la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la expresión de IFN- γ R en LiB de CG (B220⁺ CD4⁻ FAS⁺ GL7⁺; curva azul), en LiB no CG (B220⁺ CD4⁻ FAS⁻ GL7⁻; curvas rojas) y en LiT CD4⁺ (CD4⁺ B220⁻; curvas verdes) provenientes de bazo de ratones WT (líneas punteadas) o de Gal-3 KO (líneas sólidas) de 8 semanas de edad. (B) Histogramas representativos y análisis estadístico de la IFM de la expresión de T-bet en LiB de CG (B220⁺ CD4⁻ FAS⁺ GL7⁺; curva azul) y en LiB no CG (B220⁺ CD4⁻ FAS⁻ GL7⁻; curvas rojas) de bazo de ratones WT (líneas punteadas) o Gal-3 KO (líneas sólidas) de 8 semanas de edad. (C) Histogramas representativos y análisis estadístico de la IFM de la expresión de T-bet en LiT no Tfh (CD4⁺ CXCR5⁻ ICOS⁻ Foxp3⁻ B220⁻) y en Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻) de bazo de ratones WT (líneas punteadas) o Gal-3 KO (líneas sólidas) de 8 semanas de edad. En Fig. 21A-B, barras verdes representan LiT CD4⁺, barras rojas representan LiB no CG; barras azules representan LiB de CG. En Fig. 21C, barras rojas representan LiT CD4⁺ no Tfh; barras azules representan Tfh. *p < 0.05, ***p < 0.001. ns, no significativo (ANOVA de una vía; comparaciones múltiples Bonferroni). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

La ausencia de Gal-3 favorece la aparición de procesos autoinmunes tipo lupus

Como se expuso anteriormente, la generación espontánea de CGs, así como también los excesivos niveles de IFN- γ , están íntimamente relacionados con la aparición de procesos autoinmunes tales como el lupus^{158, 166, 169, 170, 248, 249, 250, 251}. En base a los resultados expuestos anteriormente (hipergammaglobulinemia, CGs espontáneos, estado genotípico y fenotípico de activación, excesivos niveles de IFN- γ), se presumió que los ratones Gal-3 KO podrían desarrollar un síndrome autoinmune. Considerando que la progresión de muchas enfermedades autoinmunes se condice con el paso de la edad, y considerando que en gran medida el desarrollo de autoAcs precede a la aparición de manifestaciones clínicas^{166, 252}, la presencia de Acs antinucleares (ANA) y el daño en tejidos fueron evaluados en ratones Gal-3 de edad avanzada (8 meses). Se observó que los ratones Gal-3 exhibieron títulos más elevados de ANA (mediana 1/640) que los ratones WT (mediana 1/40) (Fig. 22A). Los patrones de positividad observados en las improntas HEp-2 con sueros de ratones Gal-3 KO fueron los siguientes, en orden de frecuencia: nucleolar, nuclear homogéneo fino y nuclear homogéneo grueso (Fig. 22B); patrones frecuentemente asociados a LES^{253, 254, 255}.

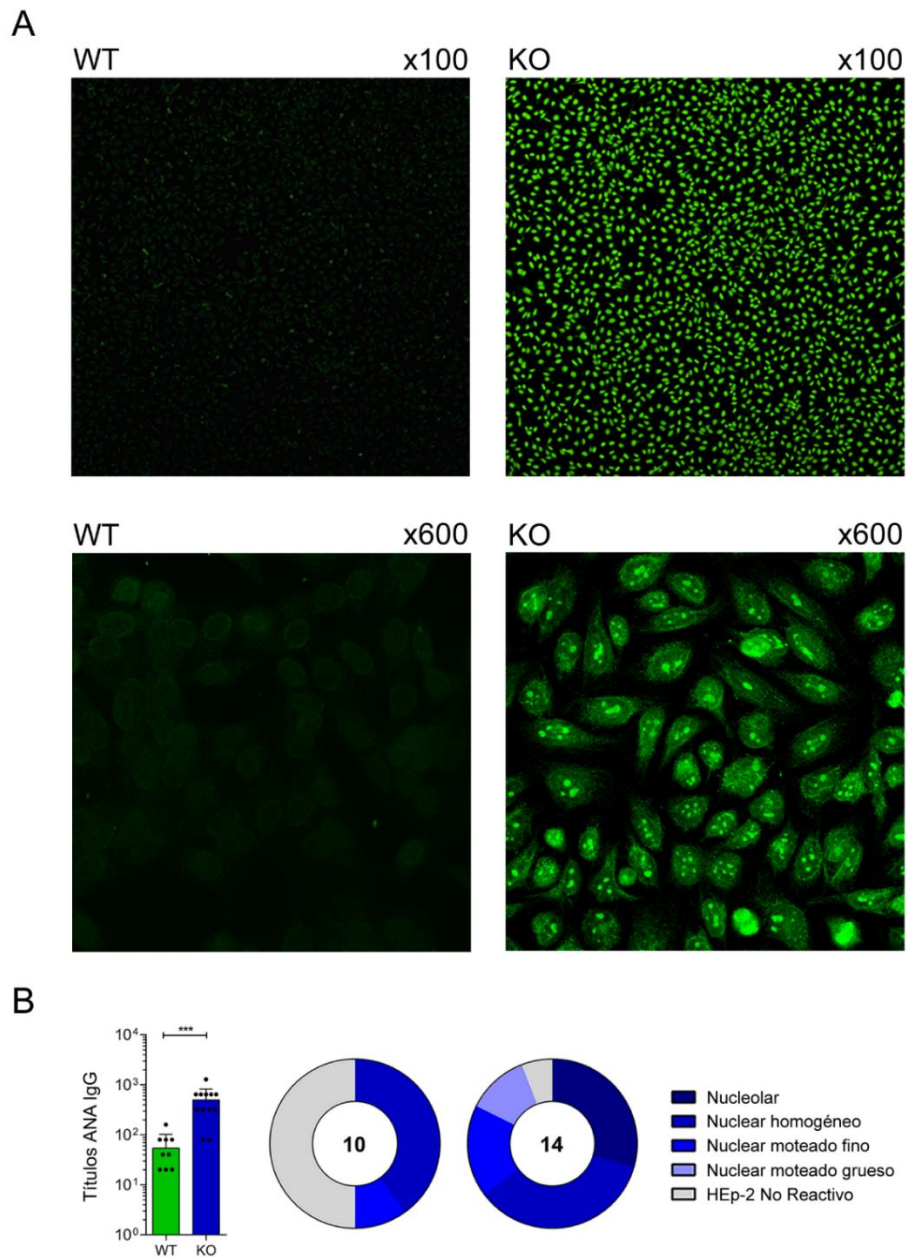


Fig. 22: Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada producen autoanticuerpos.

(A) Anticuerpos IgG antinucleares (ANA), determinados con improntas HEp-2, en suero de ratones WT y Gal-3 de 8 meses de edad. Magnificación: x100 (fotografías superiores), x600 (fotografías inferiores). (B) Títulos de ANAs IgGs evidenciados en suero de ratones WT y Gal-3 de 8 meses de edad (izquierda) y gráficos circulares (derecha) resumiendo la distribución de sueros que exhibieron diferentes patrones de fluorescencia en las improntas HEp-2: nucleolar, nuclear homogéneo, nuclear moteado fino, nuclear moteado grueso, HEp-2 no reactivo. El número en el interior del gráfico denota el número de muestras analizadas por grupo. Fueron considerados positivos aquellos animales que mostraron títulos de ANAs superiores a 1/40. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Para confirmar la presencia de ANAs determinadas con improntas HEp-2, y también con el objetivo de evidenciar a qué isotipos de Igs corresponden los mismos, se efectuó ELISA específico para diversos autoAgs e inmunofluorescencia indirecta utilizando improntas de *Crithidia Luciliae*. Los ratones Gal-3 KO presentaron en suero niveles significativamente elevados ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, unpaired Student's t-test) de IgM, IgG2c e IgG3 específicos para dsDNA, Sm/RNP e Histona, en comparación a los sueros de los ratones WT (Fig. 23). No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$, unpaired Student's t-test) entre los niveles de Acs de isotipo IgG1 específicos para cada Ag ensayado en las muestras de suero (Fig. 23).

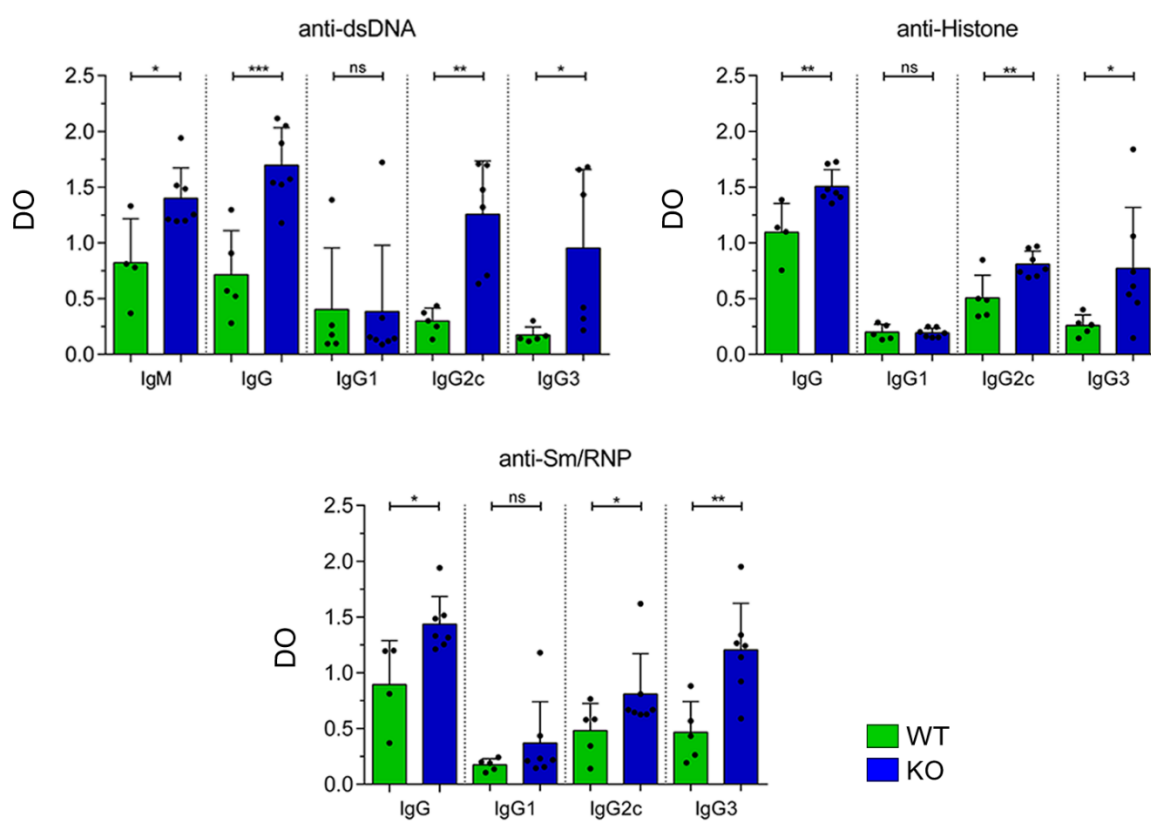


Fig. 23: Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada producen niveles de autoanticuerpos específicos para dsDNA, Histona y Sm/RNP significativamente superiores a los de los ratones WT.

Niveles de autoanticuerpos de isotipo IgM, IgG1, IgG2c e IgG3 específicos para dsDNA, Histona y Sm/RNP, determinados por ELISA, en suero de ratones WT y Gal-3 de 8 meses de edad. DO: Densidad Óptica. Barras verdes representan ratones WT, Barras azules representan ratones Gal-3 KO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Mediante el uso de improntas conteniendo *Chritidia Luciliae* fijadas como sustrato, también confirmamos que los ratones Gal-3 KO presentaban Acs anti-dsDNA (Fig. 24). En la Fig. 24 (fotografía a la derecha) se puede observar fluorescencia verde sobre los kinetoplastos de las *C. luciliae*, cuando las improntas fueron incubadas con sueros provenientes de los ratones Gal-3 KO. No se observó ningún tipo de fluorescencia cuando la muestra de suero provenía de ratones WT.

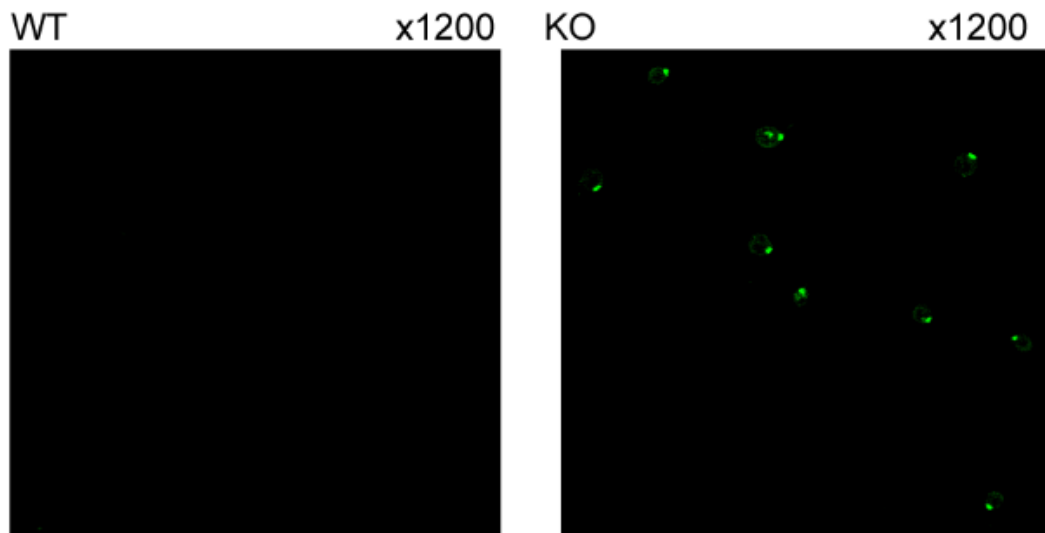


Fig. 24: Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada evidencian autoanticuerpos IgG anti-dsDNA.

Autoanticuerpos IgG anti-dsDNA, determinados sobre improntas conteniendo *Crithidia luciliae*, en suero de ratones WT y Gal-3 de 8 meses de edad. Los sueros fueron considerados positivos cuando mostraron fluorescencia verde en los kinetoplastos de los parásitos a títulos superiores a 1/10.

Es bien conocido que el riñón es uno de los órganos blanco de varias enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos ^{256, 257}, por lo que resultó sumamente importante evaluar si, efectivamente existía daño renal en los ratones Gal-3 KO. Así, cortes histológicos de riñones de ratones de 8 meses WT y Gal-3 KO fueron analizados y el grado de compromiso renal fue establecido mediante un estudio a doble ciego en el que se analizaron alteraciones morfológicas en glomérulos, túbulos e intersticio renal. Se observó que los ratones Gal-3 KO mostraron una doble capa expandida alrededor de los glomérulos con engrosamiento de túbulos, hiper celularidad glomerular e hiper celularidad en el túbulo-intersticio comparado con los riñones de los ratones WT de la misma edad (Fig. 25A-B). Con el objetivo de caracterizar el masivo infiltrado inflamatorio detectado en los ratones Gal-3KO, se realizó inmunofluorescencia sobre los cortes de riñón, utilizando anticuerpos dirigidos contra células de los principales linajes del sistema inmune. En los ratones deficientes en Gal-3 se pudo observar la presencia de estructuras

linfoides de aspecto folicular bien organizadas en donde LiB (células CD45⁺ B220⁺, amarillas/verdes) y LiT (células CD45⁺ CD4⁺, magenta/azul) se hayan en íntimo contacto (Fig. 25C), además de un gran infiltrado de origen leucocitario negativo para CD4 y B220 (células CD45⁺ B220⁻ CD4⁻, rojo).

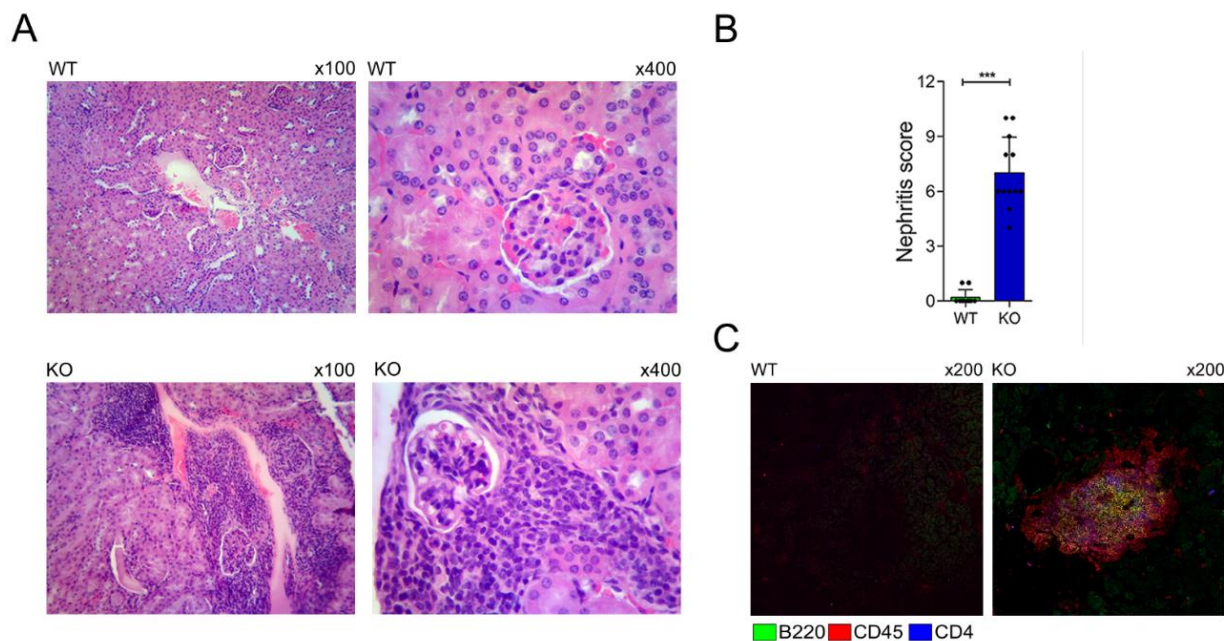


Fig. 25: Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada evidencian signos de patología renal.

(A) Secciones de riñón, teñidas con hematoxilina y eosina, de ratones WT y Gal-3 de 8 meses de edad. Magnificación: x100 (izquierda) x400 (derecha). (B) Grado de patología renal observado en la Fig. 25A graduado de 0 a 12 en base a los siguientes signos: tamaño glomerular e hiper celularidad (0-4), cambios en la matriz glomerular (0-12), grado de hiper celularidad en el espacio tubulointersticial (0-4). (C) Inmunofluorescencia de cortes de riñón teñidos con anti-B220 (verde), anti-CD45 (rojo) y anti-CD4 (azul) de ratones WT y Gal-3 de 8 meses de edad. Magnificación: x200. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Para evaluar la funcionalidad renal en los grupos de animales en estudio, se estudiaron parámetros claves en la evaluación de la función renal. Se determinaron las concentraciones de urea y creatinina en suero y de proteínas totales en orina de 24h. Se observó que los ratones Gal-3 KO presentaron niveles significativamente superiores ($p < 0.05$, unpaired Student's t-test) de creatinina en suero, acompañado con valores de proteínas totales en orina de 24h cuatro veces por encima del valor arrojado por los ratones WT (Fig. 26). Los resultados indican que los ratones deficientes en Gal-3 sufren una pérdida en la función renal.

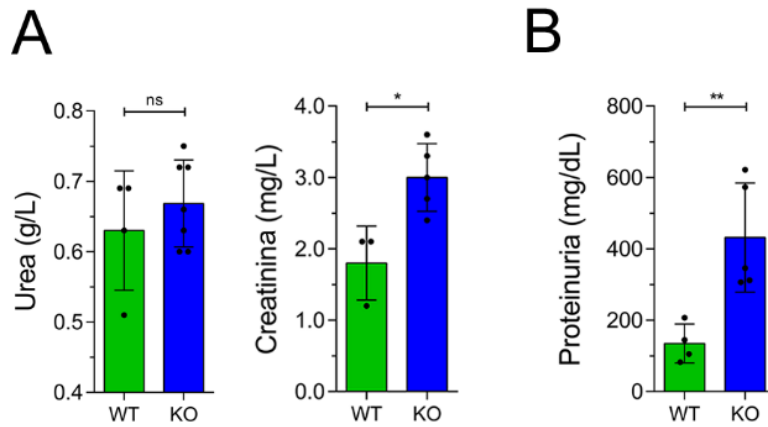


Fig. 26: Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada presentaron signos de disfuncionalidad renal.

(A-B) Concentración de urea (A) y de creatinina (B) en suero de ratones WT o Gal-3 de 8 meses de edad. (C) Concentración de proteínas totales en orina de 24h de ratones WT o Gal-3 de 8 meses de edad. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Considerando los datos anteriores que indican, en los ratones Gal-3 KO a los 8 meses de edad, la clara aparición de un síndrome autoinmune compatible con lupus, se resolvió profundizar, por citometría de flujo, la caracterización inmunológica de las poblaciones celulares presentes en bazo. Se decidió, en primera instancia, examinar la magnitud de los CGs y de las Tfh, suponiendo que éstos podrían estar afectados con el avance de la edad. Efectivamente, a las 3 semanas de vida los ratones Gal-3 KO apenas desarrollaron LiB de CGs y Tfh, pero con el avance de la edad ambas poblaciones celulares incrementaron su frecuencia hasta hacerse significativamente más elevadas ($p < 0.05$, unpaired Student's t-test) a las de un ratón WT en la adultez murina (8 semanas de vida), y pronunciarse aún más en edades avanzadas (8 meses de vida) (Fig. 27).

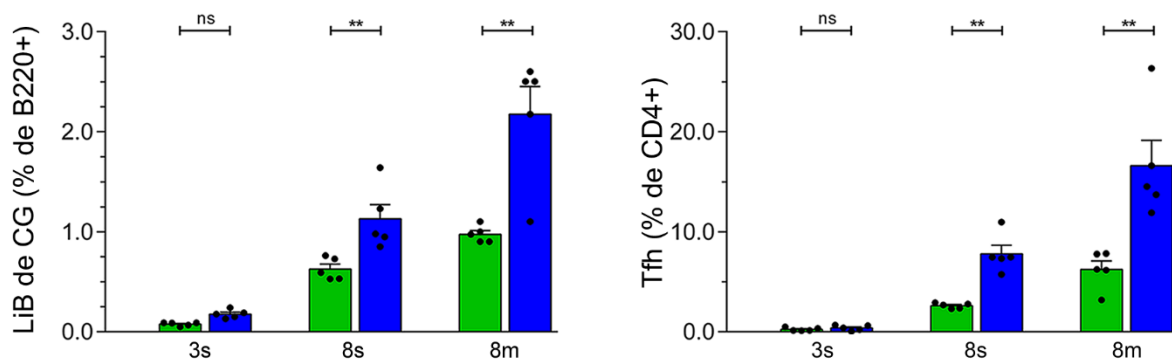


Fig. 27: La frecuencia de LiB de CG y Tfh en los ratones Gal-3 KO incrementa con la edad.

Análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG (izquierda) y Tfh (derecha) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 3 (3s) y 8 semanas (8s) y 8 meses (8m) de edad. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Compatible con estos hallazgos, se evidenció en los ratones Gal-3 KO, un significativo incremento ($p < 0.05$, unpaired Student's t-test) en el porcentaje de LiB B220⁺ Bcl6⁺ (asociados a un fenotipo de CGs) y LiB B220⁺ Blimp-1⁺ (asociado a fenotipo de plasmoblasto/CP), así como también LiB con fenotipo B_{DZ}, caracterizado por una alta expresión de CXCR4^{17, 77, 78, 79, 80} (Fig. 28A-C).

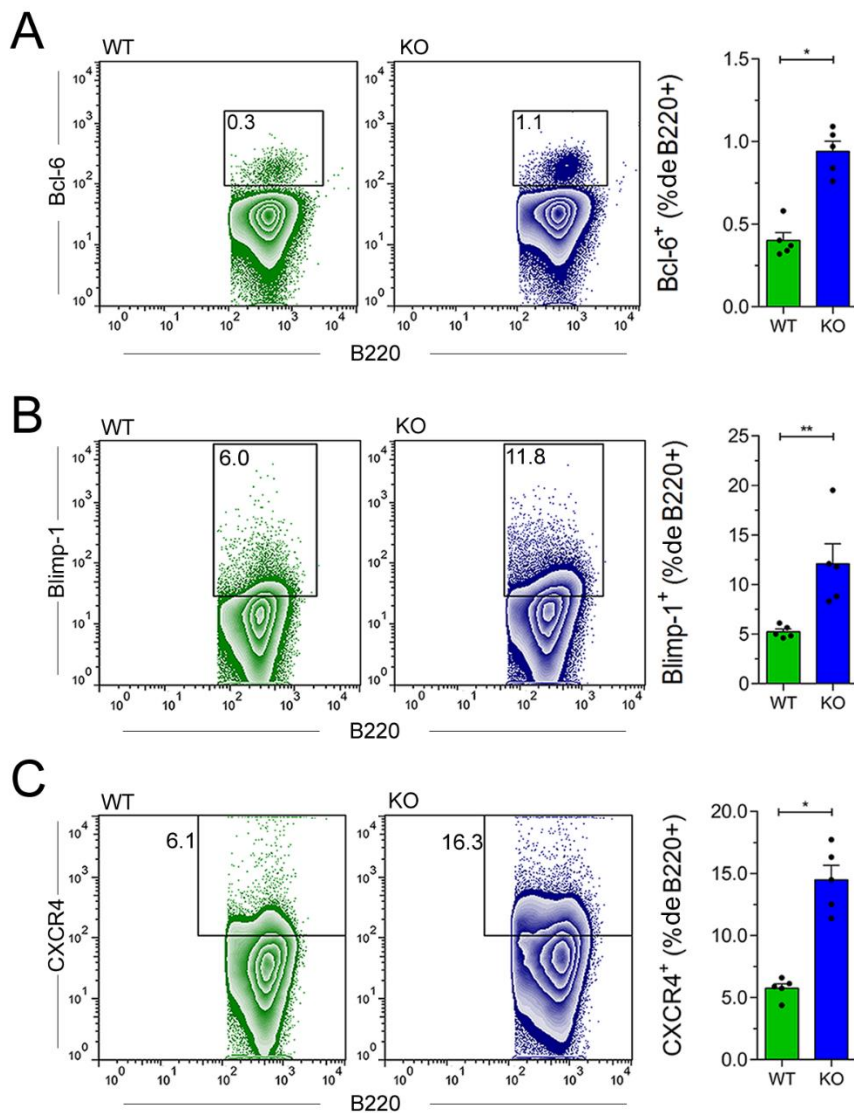


Fig. 28: Los LiB de ratones Gal-3 KO de edad avanzada exhiben pronunciada expresión de moléculas asociadas a activación y diferenciación.

(A-C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB Bcl-6⁺ (A), LiB Blimp-1⁺ (B) y LiB CXCR4⁺ (C) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 meses de edad. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. *p < 0.05, ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

A su vez, en los ratones Gal-3 KO de 8 meses de edad en comparación al grupo WT control, también se observó una frecuencia significativamente elevada ($p < 0.05$, unpaired Student's t-test) de LiB B220⁺ CD80⁺ y LiB B220⁺ CD86⁺ (Fig. 29A-B). Teniendo en cuenta de que el LPS es un potente mitógeno para LiB y que las respuestas de estas células a este estímulo *in-vitro* son extremadamente robustas^{53, 234, 235}, se decidió cultivar LiB purificados de animales WT y Gal-3 KO de 8 semanas (8s) y 8 meses (8m) de edad con LPS y durante 24 h. Luego del estímulo con LPS, los ratones Gal-3 KO presentaron una frecuencia significativamente elevada ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, unpaired Student's t-test) de LiB CD80⁺, tanto en los LiB provenientes de ratones adultos como de ratones de edad avanzada (Fig. 29C-D). Este hallazgo confirma el alto grado de activación y respuesta que desarrollan los LiB de ratones Gal-3 KO y que se incrementa con el paso del tiempo.

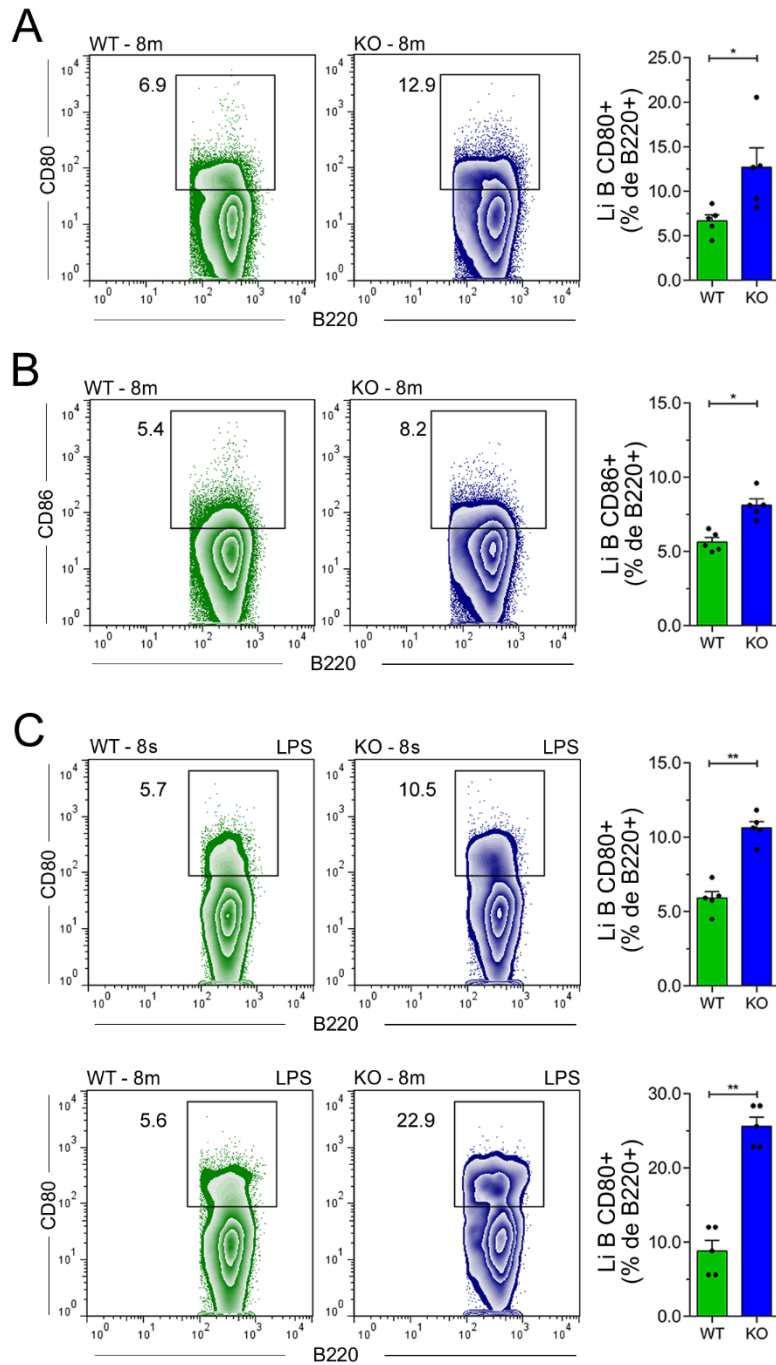


Fig. 29: Los ratones Gal-3 KO tienen altas frecuencias de LiB CD80⁺ y CD86⁺ e incrementada respuesta al LPS.

(A-B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB CD80⁺ (A) y LiB CD86⁺ (B) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 meses de edad. (C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB CD80⁺ en LiB de bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas (8s, paneles superiores) y 8 meses (8m, paneles inferiores) de edad cultivados con LPS durante 24h. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. *p < 0.05, **p < 0.005. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Con intención de profundizar aún más el conocimiento sobre el estado inmunológico de los ratones Gal-3 KO en edad avanzada, se decidió determinar los niveles de citoquinas conocidas por participar o mediar fenómenos autoinmunes que involucran autoanticuerpos: IFN- γ , IL-17 e IL-4. En conformidad a lo encontrado en ratones adultos, se observó que los ratones Gal-3 KO de 8 meses de edad presentaron niveles séricos significativamente elevados ($p < 0.01$, unpaired Student's t-test) de IFN- γ (por encima de 100 veces al valor encontrado en los ratones WT) (Fig. 30). Por el contrario, no fueron evidenciadas diferencias significativas ($p > 0.05$, unpaired Student's t-test) en los niveles séricos de IL-17 e IL-4 entre ambos grupos de ratones (Fig. 30).

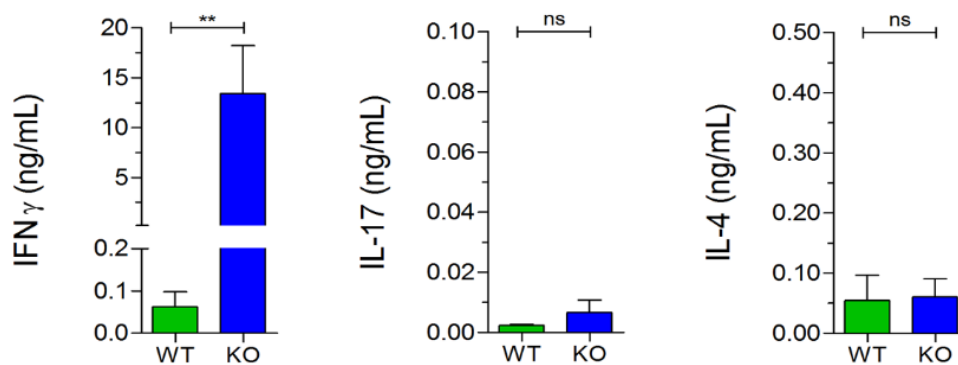


Fig. 30: Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada producen excesivos niveles de IFN- γ .

Niveles de IFN- γ , IL-17 e IL-4 en suero de ratones WT y Gal-3 KO de 8 meses de edad. Barras verdes representan ratones WT, barras azules representan ratones Gal-3 KO. ** $p < 0.005$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

El bloqueo de IFN- γ previene la generación espontánea de CG y la consiguiente autoinmunidad

Dado el notorio desbalance en los niveles de IFN- γ encontrados, y teniendo en cuenta la extensa y consistente evidencia sobre vías desreguladas relacionadas al IFN- γ vinculadas a LES^{162, 163, 202, 258, 259, 260}, se decidió investigar si el bloqueo de esta citoquina podría evitar la generación espontánea de CGs y así prevenir la aparición del síndrome autoinmune. Para esto, ratones Gal-3 KO de 4 semanas de edad (los cuales aún no habían desarrollado CGs) fueron tratados con 500 μ g de Ac monoclonal bloqueante anti-IFN- γ , cada 3 días, durante 3 semanas. Al finalizar el tratamiento, los ratones Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ presentaron una menor frecuencia de

LiB de CG, así como también de Tfh que los ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Fig. 31A-B).

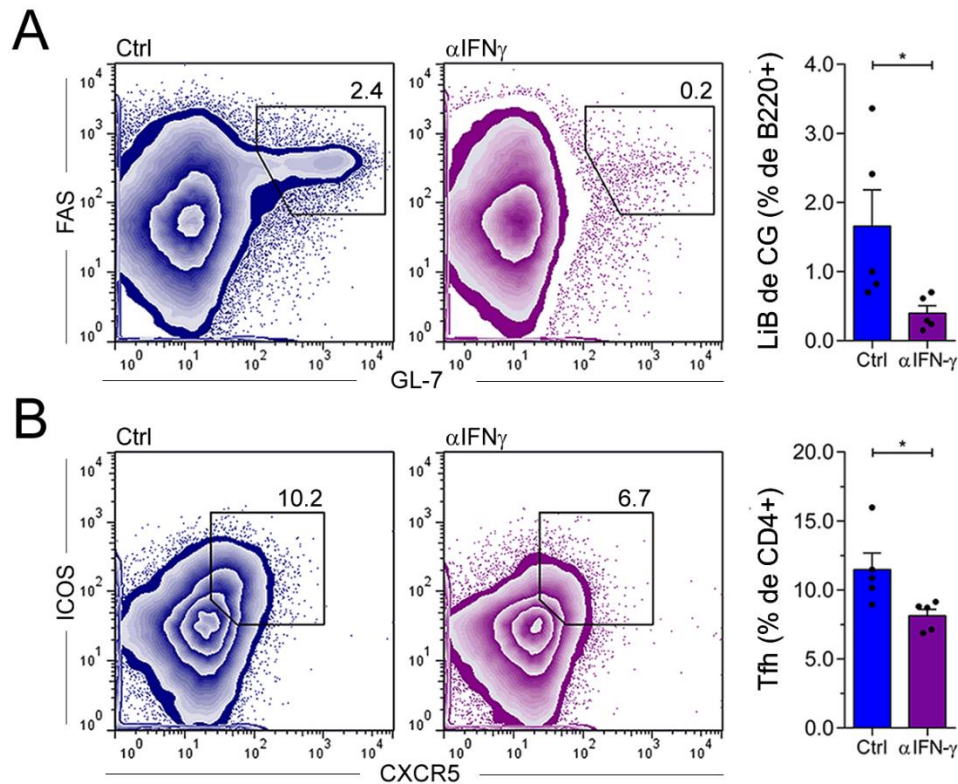


Fig. 31: El bloqueo de la señalización de IFN- γ previene la inducción espontánea de LiB de CG y Tfh.

(A-B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG (A) y de Tfh (B) en bazo de ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Ctrl) o Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ (α IFN- γ) de 8 semanas de edad. Las barras azules representan ratones Gal-3 KO Ctrl y las barras violetas a los Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ . * $p < 0.05$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

En los ratones Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ pudo observarse por inmunofluorescencia una completa ausencia de LiB de CG (PNA⁺, azul) dentro de los folículos de LiB (B220, rojo) (Fig. 32A). Como era de esperarse, los ratones Gal-3 KO tratados con Igs control generaron CGs con características típicas (Fig. 32A). Resulta sumamente interesante observar que los LiB foliculares de los ratones Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ tuvieron una clara expresión de IgD, molécula indicativa de LiB en estado virgen, indicando que, en ausencia de actividad biológica de IFN- γ , los LiB de los ratones Gal-3 KO no experimentan CSR (Fig. 32B).

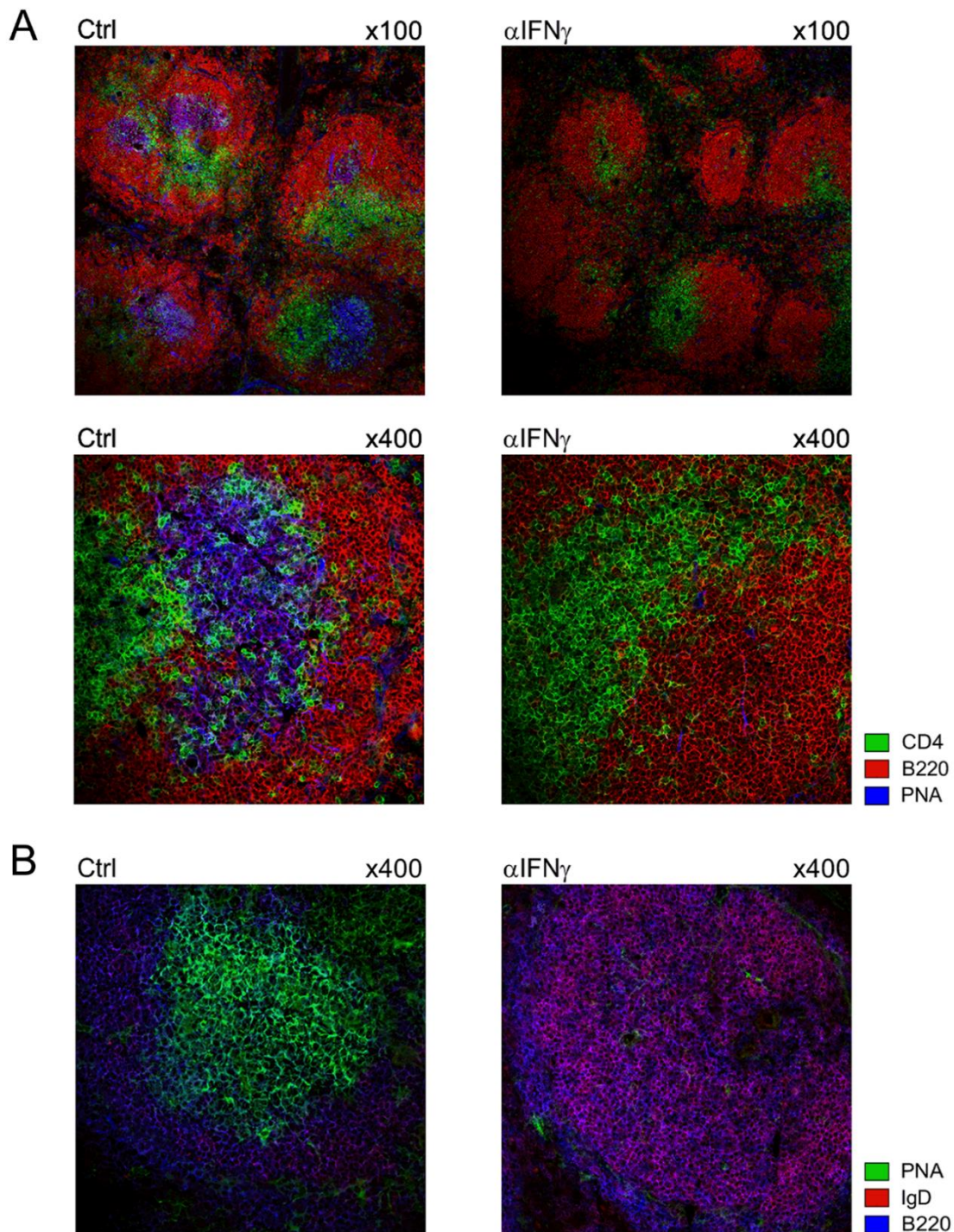


Fig. 32: El bloqueo de la señalización de IFN- γ previene la generación espontánea de CGs y el switch de isotipo.

(A-B) Inmunofluorescencia de cortes de bazo ($7\mu\text{m}$) de ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Ctrl) o Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ ($\alpha\text{IFN-}\gamma$) de 8 semanas de edad teñidos con anti-CD4 (verde), anti-B220 (rojo) and PNA (azul) (A) o con PNA (verde), anti-IgD (rojo) y anti-B220 (azul) (B). Magnificación: x400. Magnificación: x100 (A, fotografías superiores) y x400 (A, fotografías inferiores). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

El análisis de la frecuencia de LiB y LiT productores de IFN- γ en los animales Ctrl o tratados con anti-IFN- γ reveló que el bloqueo de la actividad de IFN- γ previene la generación de una alta frecuencia de LiB B220⁺ y LiT CD4⁺ productores de IFN- γ (Fig. 33A-B) y previene la expansión de LiB B220⁺ no CG que expresan IFN- γ R (Fig. 33C). Los resultados indicarían que IFN- γ posiblemente no solo tenga efecto sobre las células de CG, sino que también sobre células *bystander* que puedan tener algún rol en sostener la respuesta inmune humoral.

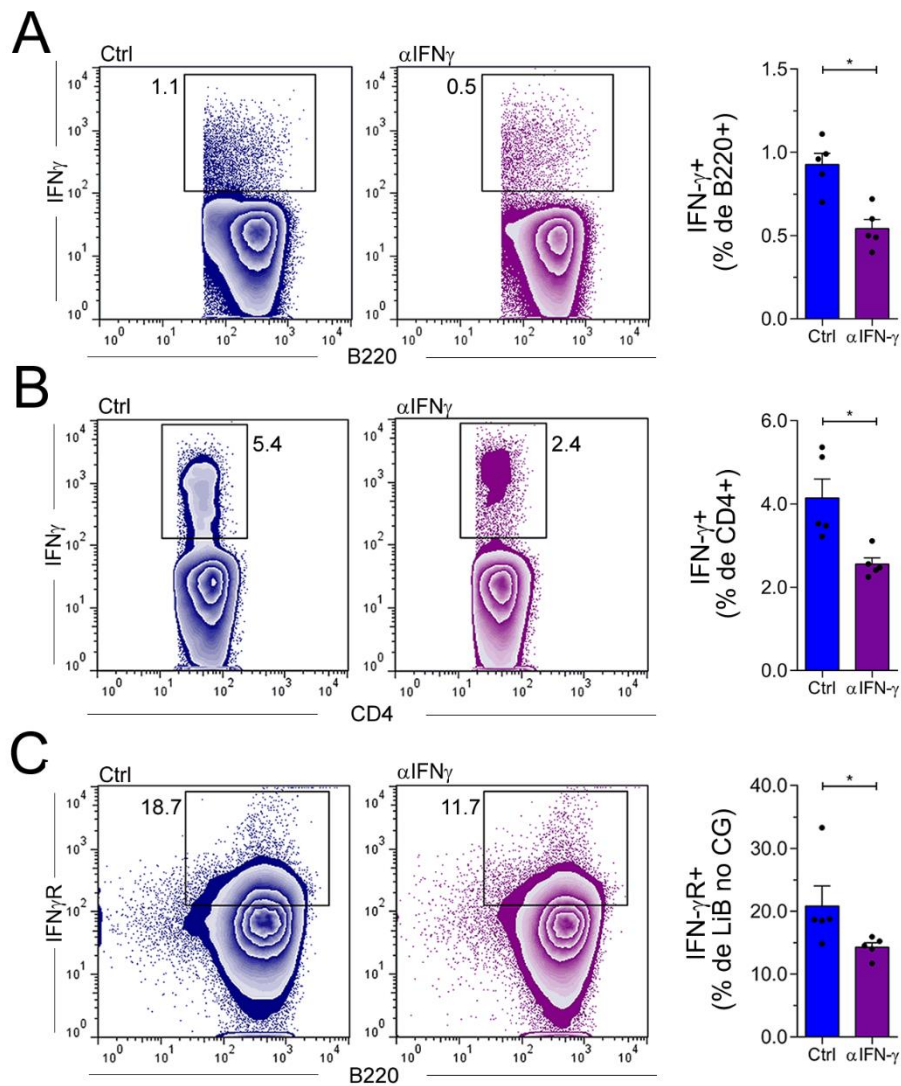


Fig. 33: El bloqueo de la señalización de IFN- γ previene la generación de una alta frecuencia de células productoras de IFN- γ .

(A-B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB B220⁺ (A) y LiT CD4⁺ (B) productores de IFN- γ en bazo de ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Ctrl) o Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ (α IFN- γ) de 8 semanas de edad. (C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB no CG IFN- γ R⁺ (B220⁺ CD4⁻ GL7⁻ FAS⁻ IFN- γ R⁺) en bazo de ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Ctrl) o Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ (α IFN- γ) de 8 semanas de

edad. Barras azules representan ratones Gal-3 KO Ctrl y las barras violetas a los Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ . * $p < 0.05$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Finalmente, se analizó si el tratamiento con anti-IFN- γ podía evitar la aparición de manifestaciones autoinmunes en los ratones deficientes en Gal-3. Se observó que los niveles de ANA determinados sobre improntas cuyo sustrato fueron las células HEP-2 fueron indetectables cuando el animal estuvo tratado con anti-IFN- γ , a diferencia de los ratones Gal-3 KO Ctrl, que presentaron títulos por encima del título de corte (1/40). A su vez, se evidenció que el bloqueo de IFN- γ evitó la acumulación de infiltrado inflamatorio en riñón (Fig. 34B). En resumen, los ratones Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ no generaron ANAs (Fig. 34A) ni evidenciaron hipercelularidad inflamatoria en riñón (Fig. 34B) en comparación a los ratones Gal-3 KO tratados con Igs control.

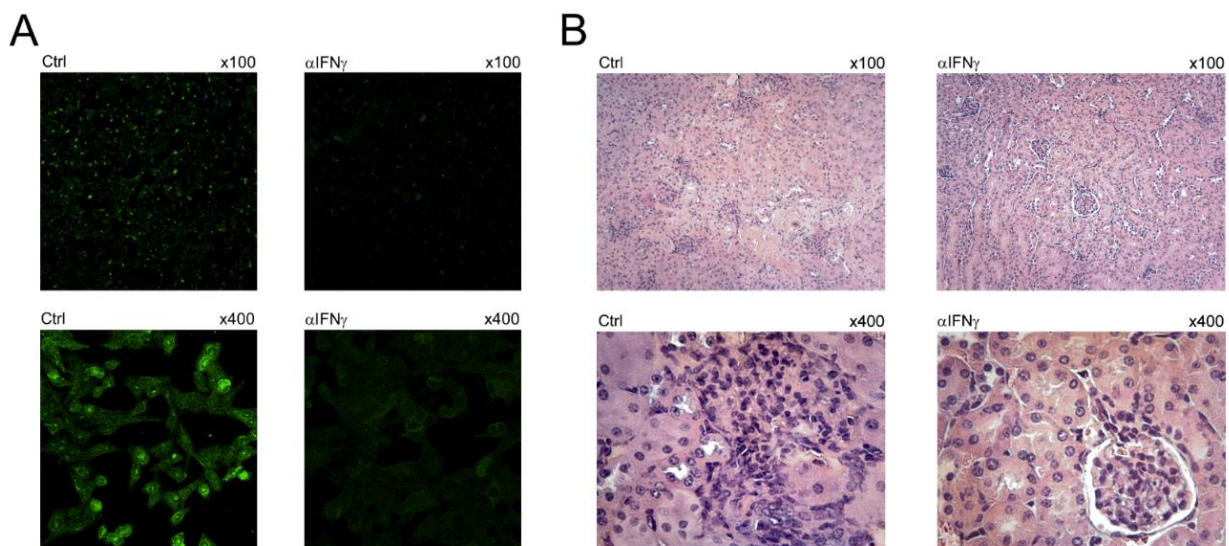


Fig. 34: El bloqueo de la señalización de IFN- γ evitó la aparición de manifestaciones autoinmunes.

(A) Anticuerpos IgG antinucleares (ANA) determinados con improntas HEP-2 en suero de ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Ctrl) o Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ (α IFN- γ) de 8 semanas de edad. Magnificación: x100 (fotografías superiores), x400 (fotografías inferiores). (B) Secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina de ratones Gal-3 KO tratados con Igs control (Ctrl) o Gal-3 KO tratados con anti-IFN- γ (α IFN- γ) de 8 semanas de edad. Magnificación: x100 (fotografías superiores) x400 (fotografías inferiores).

Estos datos en conjunto demuestran que la generación espontánea de CGs, así como la aparición de manifestaciones autoinmunes pueden ser evitadas haciendo blanco en terapias que inhiban la vía del IFN- γ en ratones Gal-3 KO.

La microflora intestinal no está involucrada en la inducción de CGs en los ratones Gal-3 KO

Dada la íntima relación que se establece entre la microbiota intestinal y el sistema inmune del hospedador, no es sorprendente que ciertos miembros de la microbiota intestinal estén asociados a enfermedades autoinmunes ^{261, 262, 263, 264}. Estudios recientes demostraron que la microbiota no solo tiene efecto local en el sistema inmune intestinal, sino que también impacta sustancialmente en diversos componentes sistémicos del sistema inmune ^{265, 266, 267, 268}. En particular fue demostrado que simples cambios en determinadas especies microbianas pueden alterar la homeostasis inmunológica y promover la aparición de enfermedades autoinmunes ^{267, 269, 270, 271}. Esas evidencias sumadas al hecho de que los ratones Gal-3 experimenten una vigorosa respuesta frente a estímulos microbianos tales como LPS, llevaron a hipotetizar que quizás la composición de la microflora intestinal en los ratones Gal-3 podría ser un inductor de la diferenciación de los LiB a LiB de CG. Uno de los primeros enfoques para analizar la influencia de la microflora fue eliminarla utilizando una combinación de antibióticos de amplio espectro (vancomicina, neomicina y metronidazol) durante 5 semanas desde las 3 semanas de vida, cuando aún los ratones Gal-3 KO no desarrollaron CGs en forma espontánea. Se observó que, a pesar de haber eliminado la microflora, la generación espontánea de CGs no pudo ser evitada ya que no hubo cambios en la frecuencia de LiB de CG ni Tfh en el bazo de los ratones Gal-3 KO (Fig. 35A,C). En ausencia de microbiota comensal se observó que los ratones WT evidencian menores frecuencias de LiB de CG y Tfh en placas de Peyer (Fig. 35B,D), como fue documentado por otros grupos de investigación ^{272,273}. No obstante, las frecuencias de LiB de CG y Tfh en Placas de Peyer de ratones Gal-3 KO tratados con antibióticos de amplio espectro no evidenciaron cambios, por lo que la inducción de estas células es independiente de la presencia de la microflora comensal (Fig. 35B,D).

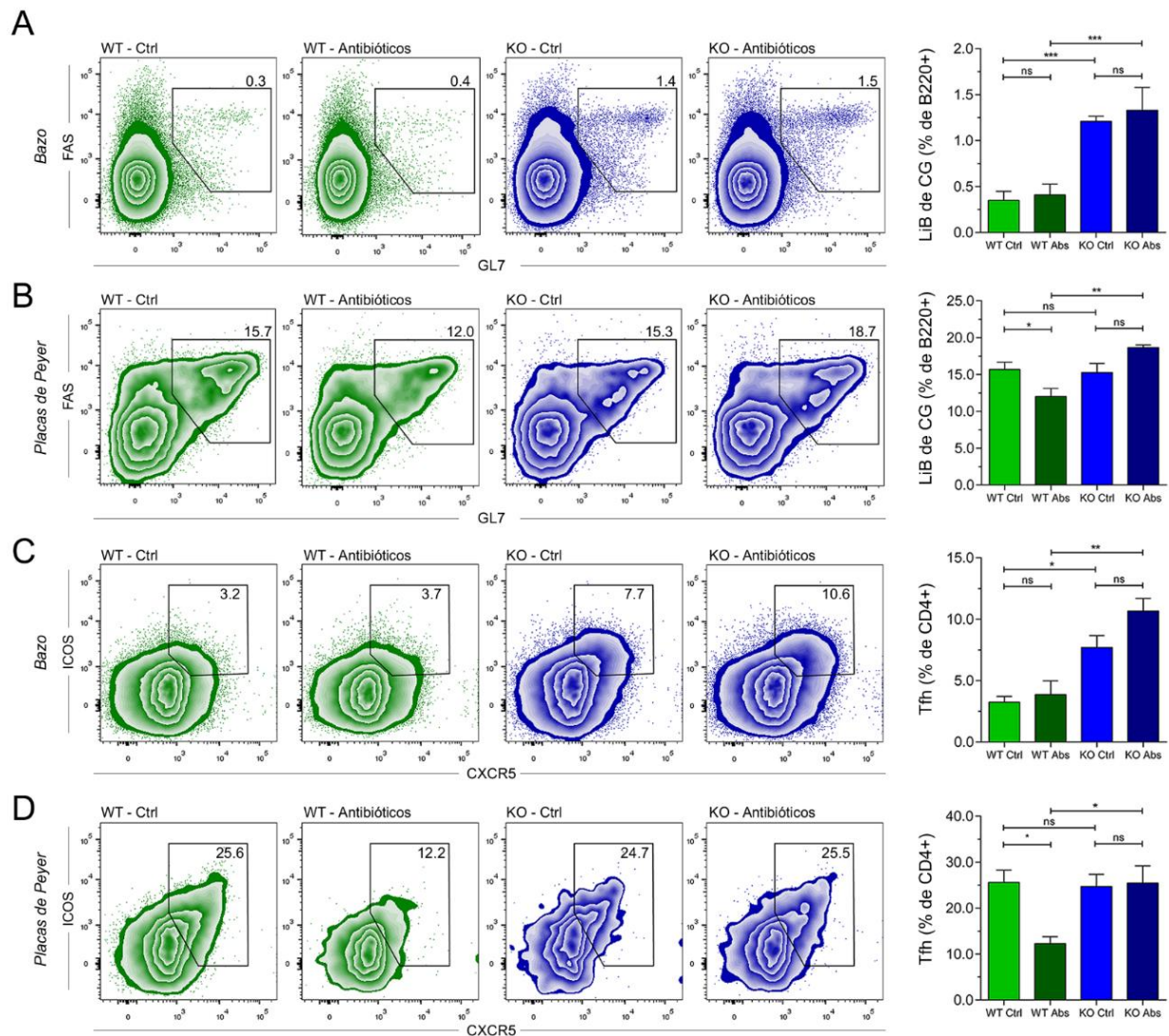


Fig. 35: El tratamiento con antibióticos de amplio espectro no modifica la inducción de CGs en los ratones Gal-3 KO.

(A,C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG (B220⁺ FAS⁺ GL7⁺ CD3⁻) en bazo (A) y placas de Peyer (C) de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad que recibieron agua control (Ctrl) o antibióticos de amplio espectro (Antibióticos). (B,D) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻) en bazo (B) y placas de Peyer (D) de ratones WT y Gal-3 KO de 8 semanas de edad que recibieron agua control (Ctrl) o antibióticos de amplio espectro (Antibióticos). Barras verde oscuro representan ratones WT tratados con Abs, barras verde claro representan ratones WT Ctrl, barras azul oscuro representan ratones Gal-3 KO tratados con Abs, barras azul claro representan ratones Gal-3 KO Ctrl. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. ns, no significativo (ANOVA de una vía; comparaciones múltiples Bonferroni). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

La segunda estrategia para dilucidar si la flora intestinal bacteriana promovió la generación espontánea de CGs fue efectuar experimentos de co-vivienda, con el objetivo de determinar si el fenotipo observado en los ratones Gal-3 KO podría transferirse a los WT y viceversa al compartir la microflora. Para ello, ratones WT y Gal-3 KO apenas destetados se alojaron en las mismas viviendas durante dos meses. Se observó que, luego de transcurridos los dos meses de la co-vivienda, los ratones Gal-3 KO no indujeron LiB de CG ni Tfh en los ratones WT, y tampoco los ratones WT evitaron la generación de LiB de CG o Tfh en los ratones Gal-3 KO (Fig. 36A-B), por lo que no hubo transferencia de los fenotipos observados en cada genotipo de ratón hacia el otro. En conclusión, no hubo inducción de CGs en los ratones WT ni se evitó la generación espontánea de CGs en los ratones Gal-3 KO (Fig. 36A-B).

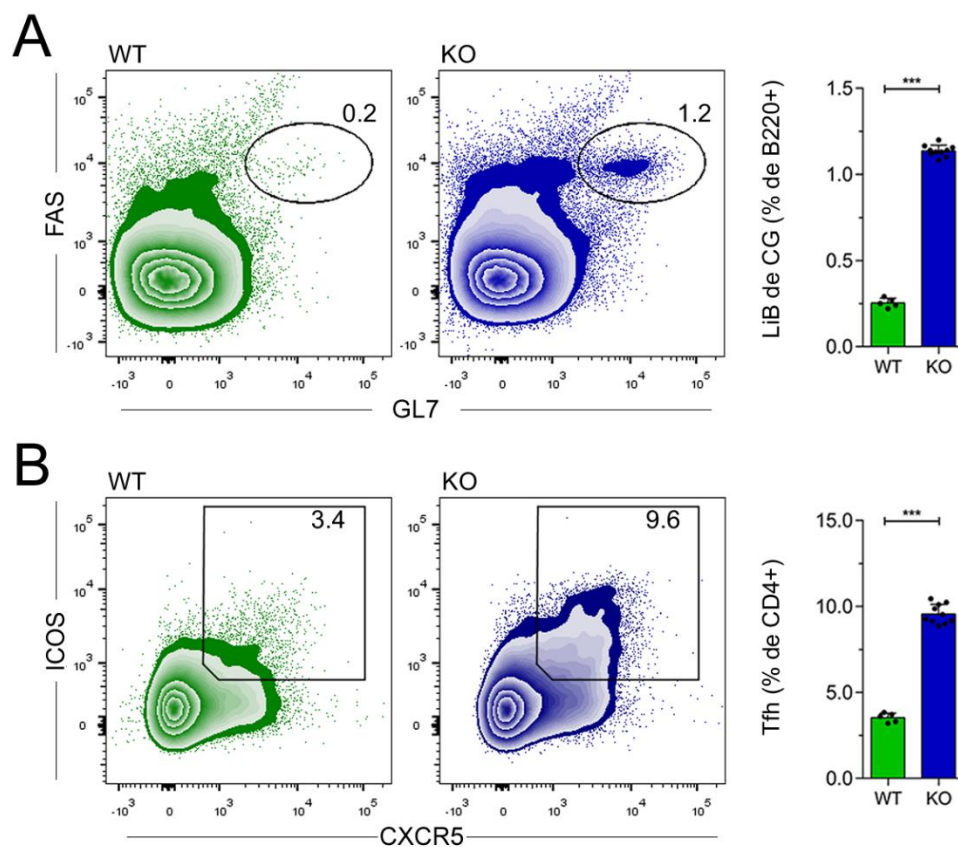


Fig. 36: Los ratones WT y Gal-3 KO no transfieren su fenotipo el uno al otro en experimentos de co-vivienda.

(A-B) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG ($B220^+ FAS^+ GL7^+ CD3^-$) (A) o de la frecuencia de Tfh ($CD4^+ CXCR5^+ ICOS^+ Foxp3^- B220^-$) (B) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO co-alojados desde su destete. Barras verdes representan ratones WT, barras azules

representan ratones Gal-3 KO. *** $p < 0.001$. ns, no significativo (Student's t-test para datos no apareados). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Estos datos en conjunto sugieren que ligandos de la microbiota intestinal no estarían involucrados en la inducción de CGs autorreactivos en los ratones Gal-3 KO.

La administración de Gal-3 exógena no reprime la generación de CGs espontáneos

Aunque los efectos intrínsecos de la deficiencia de Gal-3 en las células son los que causan fallas en los mecanismos de tolerancia y conducen a la generación espontánea de CGs, hipergammaglobulinemia y autoinmunidad, aún no había sido investigado si la administración exógena de Gal-3 recombinante podría revertir el fenómeno observado. Para evaluar la contribución de Gal-3 exógena, se administró Gal-3 recombinante vía intraperitoneal siguiendo tres esquemas de dosis documentadas en la literatura ^{274, 275, 276}: 12ug (única vez), 24ug (única vez), y 24ug (dos veces espaciadas por 3 días) y se obtuvieron los bazos a los 6 días post-inyección. Se observó que luego de la inyección de Gal-3 recombinante, los ratones Gal-3 KO no evidenciaron reducción en la frecuencia de LiB de CG (aunque fue observada una sutil pero no significativa reducción, $p > 0.05$, unpaired Student's t-test), ni Tfh, ni en la frecuencia de LiT CD4⁺ productores de IFN- γ (Fig. 37A-C). Estos experimentos enfatizan lo documentado por muchos grupos sobre las diferentes funciones que lleva a cabo Gal-3 dependiendo su lugar de acción (intracelular/extracelular).

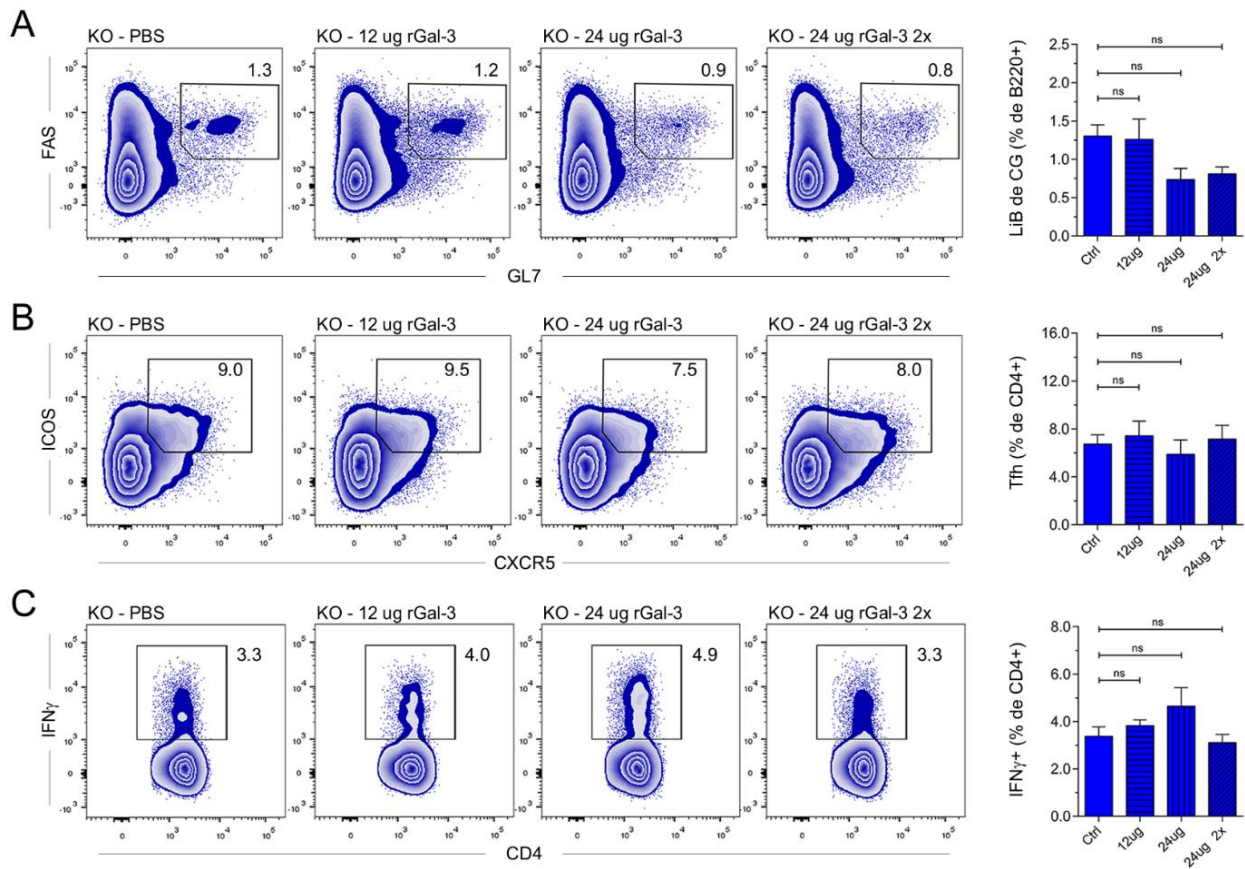


Fig. 37: La administración exógena de Gal-3 recombinante no reprime la generación espontánea CGs.

(A-C) Gráficos de densidad de puntos y análisis estadístico de la frecuencia de LiB de CG (B220⁺ FAS⁺ GL7⁺ CD3⁻) (A), Tfh (CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ Foxp3⁻ B220⁻) (B) y LiT CD4⁺ productores de IFN- γ (C) en bazo de ratones WT y Gal-3 KO de 12 semanas de edad inyectados intraperitonealmente con PBS (Ctrl) o con Gal-3 recombinante a diferentes dosis (12 μ g en dosis única; 24 μ g en dosis única y dos dosis de 24 μ g cada una). Barras azules sólidas representan ratones Gal-3 KO Ctrl, barras azules con líneas horizontales ratones Gal-3 KO tratados con 12 μ g en dosis única, barras azules con líneas verticales ratones Gal-3 KO tratados con dos dosis de 24 μ g cada una, barras azules punteadas ratones Gal-3 KO tratados con 12 μ g en dosis única. ns, no significativo (ANOVA de una vía; comparaciones múltiples Bonferroni). Los datos son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Discusión

El último gran avance en la evolución de los vertebrados fue el advenimiento de los ganglios linfáticos y la formación de CGs en los mamíferos placentarios ^{277, 278, 279}; únicos animales de la evolución capaces de generar FDCs, actores fundamentales en la formación de folículos de LiB y en la maduración de la afinidad. En la última década se han alcanzado considerables progresos que posibilitaron un entendimiento más profundo de la reacción de CG, escenario principal de respuesta de LiB. Este entorno fuertemente evolutivo, da como resultado la generación de anticuerpos altamente específicos y duraderos en el tiempo cuya función es la de inhabilitar, destruir o combatir una infinidad de microorganismos. El estudio de la respuesta inmune humoral de los últimos años permitió definir un paisaje increíblemente complejo de eventos posteriores al encuentro con un Ag, que culminan con la formación de un CG maduro óptimamente estructurado para la selección de clones mutantes de alta afinidad ^{26, 96}. Sin embargo, aún permanecen inciertas grandes cuestiones respecto a la identidad algunas de las células involucradas en esta reacción; los intrincados mecanismos de control logrados mediante la integración de programas transcripcionales, postranscripcionales y epigenéticos; así como también cuáles son las señales y eventos que actúan en la decisión de un LiB respecto su destino final.

Por otra parte, el gran número de interacciones moleculares y celulares que se suscitan en los CGs no solo tiene como objetivo la generación de clones altamente afines para un Ag extraño, sino también la eliminación de aquellos clones que puedan reaccionar contra Ags propios y mantener, así, la autotolerancia ^{152, 156, 175}. Esto presenta un gran desafío para el organismo, ya que la aparición de células autorreactivas provoca la generación de autoanticuerpos capaces de unirse a componentes propios, con la consecuente afectación y/o destrucción de tejidos y órganos. La aparición de LiB autorreactivos que experimentaron CSR y SHM se da en el contexto del surgimiento de CGs espontáneos autoinmunes ^{152, 175, 250}, gatillado principalmente por defectos

intrínsecos en los LiB (quienes se diferenciarán a LiB de CG) o en los LiT CD4⁺ (quienes se diferenciarán a Tfh), o por una combinación de ambos defectos. Los CGs espontáneos autorreactivos generan una población celular de larga vida que es crucial para el mantenimiento y propagación de diversos procesos autoinmunes sistémicos. Las LLPC producidas en CGs espontáneos autoinmunes secretan anticuerpos de múltiples isotipos (al haber experimentado CSR) y de alta afinidad (al haber experimentado SHM). A su vez, los CG espontáneos también generan LiB de memoria que pueden participar en la generación de nuevos CGs autorreactivos y perpetuar la respuesta autoinmune ^{98, 175, 280}.

Es interesante el aporte de varios estudios que determinan que, curiosamente, muchos factores y vías de señalización que son vitales para la generación de CGs espontáneos, no son requeridos para la formación de CGs inducidos por Ags extraños, sugiriendo que existen diferentes mecanismos de control entre los CGs de diferente naturaleza ²⁵⁰. Esta es una ventaja gigantesca para el diseño e implementación de terapias dirigidas que sólo limiten las respuestas autoinmunes sin recurrir a terapias inespecíficas de inmunosupresión. Por tal motivo, resulta imprescindible comprender la complejidad de interacciones celulares y moleculares, así como también los eventos dinámicos involucrados en la reacción de CG para intervenir, en consecuencia, eficientemente.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral proporcionan la primera evidencia de la participación de Gal-3 como molécula clave en la reacción de CG. Previamente, nosotros y otros hemos identificado que Gal-3 regula nichos de LiB en ganglios linfáticos e inhibe la diferenciación de CP *in vitro* ²²⁰ e *in vivo* ²⁸¹. Nuestros estudios revelaron que Gal-3 se expresa en LiB en *steady-state* ²²⁰, y disminuye su expresión luego de la activación de los mismos con estímulos T-independiente (LPS) o T-dependiente (CD40L + IL-4) (Fig. 5). Estos estímulos, a su vez, favorecen la diferenciación de LiB a CP, lo que sugiere que la regulación negativa de Gal-3 puede ser necesaria para el programa de diferenciación a CP. En consecuencia, hemos demostrado que los ratones que carecen de Gal-3 tienen hipergammaglobulinemia (principalmente debido a elevadas

concentraciones de IgG2c e IgG3) y una mayor frecuencia de ASCs tanto en bazo como en MO (Fig. 6).

Curiosamente, IgG2c e IgG3, subclases de Ig elevadas en los ratones Gal-3 KO, activan eficazmente Fc γ R (receptores estimuladores) y el complemento, y muestran la actividad patogénica más alta entre todos los isotipos de Igs²⁸². Es bien sabido que la producción de estas subclases de Ig están promovidas por IFN- γ ²⁸³ y que las mismas están estrechamente relacionadas con el desarrollo y la progresión de enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos, como el lupus. Sin ningún tipo de inmunización ni infección voluntarias, los ratones Gal-3 KO desarrollan espontáneamente CGs en bazo (Fig. 7-9). Evidenciamos que el aumento en el número de LiB de CG depende de la edad, ya que estas estructuras aparecen a partir de la 4ta semana post-nacimiento y aumentan con el paso del tiempo, acompañado también por una expansión de células Tfh (Fig. 27). Notablemente, la proporción Tfh:Tfr fue significativamente mayor en los ratones Gal-3 KO en comparación con sus contrapartes WT (Fig. 10). Se ha descrito que el equilibrio entre Treg y células T efectoras es crítico para un adecuado control de la calidad y la magnitud de las respuestas inmunes adaptativas y para establecer o vulnerar la tolerancia a Ags propios y extraños^{84, 284}. Por lo tanto, el aumento en la proporción de células Tfh respecto Tfr en ratones Gal-3 KO podría tener un impacto en la promoción del desarrollo de CGs en ratones Gal-3 KO, dando como resultado reacciones de CG descontroladas y el posterior desarrollo de enfermedades autoinmunes^{87, 285}.

Para comprender mejor la relación entre Gal-3 y el programa de diferenciación de LiB, comparamos los niveles de expresión génica de los LiB de ratones WT con los de los Gal-3 KO. Los ratones Gal-3 KO mostraron una expresión aumentada de genes relacionados con la activación de LiB y la formación de CGs, tales como *Mki67*, *Aicda*, *Lilrb4*, *Itga1*, genes que codifican cadenas pesadas de Igs y otros (Fig. 12). Curiosamente, encontramos niveles de transcritos aumentados de miRs, que coordinan la formación de CGs, influyen en la CSR y en la SHM, y favorecen la diferenciación hacia CP y Bmem,

tales como miR-155²⁸⁶ y miR-217²⁸⁷. Estos ARN cortos no codificantes están dirigidos a múltiples factores, además de regular AID, Bcl-6 y Blimp-1. Del mismo modo, encontramos un gran número de miRs con funciones aún no identificadas, expresados de manera diferencial en LiB de ratones Gal-3 KO y WT, muchos de los cuales podrían influir también en el desarrollo de la reacción de CG. Dada la capacidad de Gal-3 para unirse a diferentes moléculas, como el ARN²⁸⁸, proteínas adaptadoras implicadas en el transporte de proteínas (como Alix²¹⁹), factores de transcripción (como Bcl-2²⁸⁹), y componentes del complejo ribonucleoproteína nuclear²⁹⁰, es probable que esta lectina pueda actuar como regulador de genes, ya sea directa o indirectamente.

Al evaluar la expresión de moléculas que tienen un papel crítico en la regulación de la reacción de CG revelamos que los ratones Gal-3 KO tienen mayores frecuencias de LiB CD80⁺ y CD86⁺ (Fig. 13, 29), así como también una frecuencia notablemente mayor de LiB CD80⁺ post estimulación vía TLRs en comparación con LiB de ratones WT (Fig. 29). Ya fue descrito que la expresión de CD80 en los LiB desempeña un papel crítico tanto en las respuestas de CGs tempranas como tardías²⁹¹. Los ratones CD80^{-/-} evidencian menos células Tfh en comparación con la de WT, y las células Tfh residuales no logran alcanzar una óptima maduración, mostrando una expresión disminuida de ICOS y PD-1 y menor producción de IL-21²⁹¹. Usando quimeras de MO, los autores demostraron un requerimiento intrínseco de CD80 en los LiB para el desarrollo normal de células Tfh y CP²⁹¹. Por otra parte, se documentó también una alta expresión de CD80 y CD86 en LiB de pacientes con LES²⁹². En nuestro modelo, el mayor porcentaje de LiB CD80⁺ y CD86⁺ en los ratones con deficiencia de Gal-3 posiblemente facilita la inducción de Tfh, lo que a su vez permitiría y perpetuaría la respuesta de CG. Es posible que el aumento en la expresión de CD80 y CD86 en los LiB de ratones Gal-3 KO sea el resultado de las elevadas concentraciones de IFN- γ detectadas en esos ratones, en lugar de un efecto directo de Gal-3 en la regulación de la expresión de estas proteínas, como se ha informado previamente²⁹³.

Una pregunta fundamental que surge respecto a la influencia de Gal-3 en la respuesta de CGs es si el desarrollo espontáneo de estas estructuras es inducido por la falta de Gal-3 específicamente en LiB o si Gal-3 influencia tanto a LiB como a LiT. La transferencia adoptiva de LiB vírgenes en ratones μ MT deficientes en LiB o en ratones WT mostró que, en ambos casos, los niveles séricos de IgG2c e IgG3 aumentaban solo en ratones transferidos con LiB deficientes en Gal-3 (Fig. 14). Estos datos sugieren que los LiB deficientes en Gal-3 pueden diferenciarse y secretar Igs independientemente de un entorno suficiente en Gal-3. Asimismo, los co-cultivos de células B y T vírgenes de ratones WT y Gal-3 KO mostraron que los LiB deficientes en Gal-3 estimulados producían niveles más elevados de Igs en comparación con LiB suficientes en Gal-3, independientemente de la presencia o ausencia de LiT deficientes o suficientes en Gal-3. Usando ratones quimeras de MO, pudimos demostrar que la falta de Gal-3 en los LiB es, en sí misma, suficiente para desencadenar la alteración de la tolerancia inmunológica y favorecer la generación de CGs espontáneos (Fig. 14). Por otra parte, la evidencia provista por otros grupos ha demostrado que la ausencia de Gal-3 también regularía ciertas funciones de las células T CD4⁺. Huan-Yuan Chen y colaboradores encontraron que Gal-3 inhibe la activación de LiT y funciona intracelularmente promoviendo la regulación negativa del TCR ²¹⁹. En nuestro trabajo, también observamos que en ausencia de Gal-3 los LiT CD4⁺ producen más IFN- γ (probablemente por señales proporcionadas por LiB deficientes en Gal-3) (Fig. 17, 18, 20). Si bien en la presente tesis no dilucidamos el efecto intrínseco de Gal-3 en los LiT CD4⁺, y por lo tanto tampoco en los Tfh, podemos establecer que la falta de Gal-3 en los LiB es suficiente para iniciar la generación espontánea de CGs. Probablemente, la deficiencia de Gal-3 en los LiT CD4⁺ contribuye al fenómeno, manteniendo y propagando la condición autoinmune humoral, a través de la producción, principalmente, de IFN- γ .

Los LiB de CG y los Tfh que emergen espontáneamente desempeñan un papel crucial en la generación de autoanticuerpos patogénicos de alta afinidad en muchas enfermedades autoinmunes ^{146, 168, 294, 295, 296, 297}. En consonancia, evidenciamos en ratones

Gal-3 KO la presencia de ANAs, incluyendo anti-dsDNA, anti-Histona y anti-SM/RNP (Fig. 22-24), y afectación renal (Fig. 25-26), ambas características cardinales de enfermedades autoinmunes sistémicas, tales como el lupus. Curiosamente, los ratones Gal-3 KO también presentan estructuras linfoides bien organizadas en las que las células B y T interactúan íntimamente entre sí. Esta observación sugiere que estos agregados T:B en los riñones probablemente promuevan la secreción local de autoanticuerpos patogénicos contribuyendo a la aparición de una patología similar al lupus. En cuanto a la funcionalidad renal, los ratones Gal-3 KO exhibieron mayores concentraciones de creatinina en suero, así como también elevada concentración de proteínas en orina de 24 horas, en comparación con los ratones WT, lo que sugiere una pérdida de la función renal (Fig. 26).

Acorde al perfil de isotipo de Igs evidenciados en suero, se observaron niveles marcadamente elevados de IFN- γ en suero y un aumento en el número de células productoras de IFN- γ en ratones Gal-3 KO (Fig. 17, 18, 20, 30). El aumento en los niveles de IFN- γ en condiciones no infecciosas ni malignas, puede favorecer el desarrollo de anticuerpos anti-dsDNA y anti-Histona, glomerulonefritis y autoinmunidad sistémica²⁹⁸. La capacidad del IFN- γ para promover el cambio de isotipo IgG a autoanticuerpos altamente efectores (IgG2c e IgG3 en ratones), la activación de los receptores Fc γ , y la activación del complemento también podría contribuir a la gravedad de la enfermedad²⁹⁹. La mutación ROQUIN (Rc3h1) en ratones Roquinsan/san, modelo de lupus espontáneo, conduce a una disminución de la degradación del ARNm para IFN- γ , resultando en un incremento en la señalización de IFN- γ y en la acumulación de células Tfh, culminando en un aumento de LiB de CG y autoanticuerpos¹⁶⁸. Notablemente, IFN- γ R juega un papel crucial en el desarrollo de condiciones autoinmunes, demostrado recientemente en varios modelos murinos^{162,163,168}. Jackson y colaboradores demostraron que la presentación antigénica por LiB en el contexto del MHC II es crítica para la expansión de las células T CD4⁺ productoras de IFN- γ y el desarrollo espontáneo de CGs. A su vez, evidenciaron también que la delección de IFN- γ R en LiB evitó la

producción de autoanticuerpos hipermutados, la esplenomegalia y la glomerulonefritis por complejos inmunes ¹⁶³. En un estudio separado, Domeier y colaboradores comprobaron que la señalización de IFN- γ R en LiB es necesaria para la formación espontánea de CCs y el desarrollo de células Tfh en ratones B6 no autoinmunes. A su vez, demostraron que la deficiencia global de IFN- γ R o intrínseca en LiB reducía la formación espontánea de CGs en ratones B6.Sle1b propensos al lupus, conduciendo a una reducida producción de autoanticuerpos IgG2c y al desarrollo de glomerulonefritis ¹⁶². En nuestro estudio, además de la excesiva producción de IFN- γ , comprobamos que los LiB y los LiT de ratones Gal-3 KO también expresan niveles más elevados de IFN- γ R así como también mayores niveles de T-bet, factor de transcripción relacionado íntimamente con la producción y respuesta a esta citoquina, en comparación con los ratones WT (Fig. 21), lo que sugiere que la ausencia de Gal-3 condiciona ambas poblaciones de linfocitos hacia una mejor respuesta a IFN- γ . De la misma forma, evidenciamos una dependencia entre los niveles incrementados de IFN- γ , las elevadas frecuencias de LiB de CG y Tfh, y la generación de autoanticuerpos e infiltrado renal en los ratones Gal-3 KO, ya que inhibiendo la señalización de IFN- γ con anticuerpos bloqueantes, las alteraciones en la respuesta inmune humoral evidenciadas en los Gal-3 KO no son detectadas (Fig. 31-34).

Por otra parte, recientemente se documentó la relación entre la falta de Gal-3 y el aumento en los niveles de IFN- γ , en contextos de malignidad. En estos reportes, se evidenció por un lado niveles elevados de IFN- γ en ratones Gal-3 KO con melanoma ³⁰⁰ y por otro que LiT CD4⁺ incubados con DCs knockdown en Gal-3 produjeron más IFN- γ que los incubados con DCs control ³⁰¹. En concordancia, Tseng y colaboradores demostraron que Gal-3 puede disminuir la señalización de IFN- γ al facilitar la señalización de AKT/GSK-3b/SHP2 ³⁰².

Otro punto sustancial que considerar es el posible vínculo entre microbiota y autoinmunidad ³⁰³. Los LiB de ratones Gal-3 KO responden más enérgicamente al LPS

que los LiB de ratones WT (Fig. 29). Estos resultados, junto con la observación de que los CGs aparecen en ratones Gal-3 KO después del período de lactancia, nos llevan a la hipótesis de que la microbiota intestinal podría ser un estímulo que induce a los LiB a diferenciarse en LiB de CG. Sin embargo, cuando los ratones Gal-3 KO fueron tratados con una mezcla de antibióticos de amplio espectro para reducir la microbiota, no se observaron cambios en la frecuencia de LiB de CG ni de Tfh en bazo en comparación con los ratones no tratados (Fig. 35). Del mismo modo, experimentos de co-housed entre ratones Gal-3 KO y WT no revelaron inducción de CGs en ratones WT ni prevención de CGs espontáneos en ratones Gal-3 KO, lo que sugiere que ligandos de la microbiota intestinal no estarían involucrados en la inducción de los CGs espontáneos autorreactivos en ratones Gal-3 KO (Fig. 36). No obstante, no descartamos la presencia de alteraciones en comunidades microbianas que puedan facilitar el mantenimiento y magnitud de los CGs evidenciados.

Aunque los efectos de la deficiencia intrínseca de Gal-3 en las células son los que causan fallas en los mecanismos de tolerancia y conducen a la generación espontánea de CGs e hipergammaglobulinemia, nos preguntamos si el tratamiento con Gal-3 exógena recombinante podría revertir el fenómeno evidenciado. Observamos que después del tratamiento con Gal-3 recombinante, los ratones no fueron capaces de normalizar los niveles de IFN- γ , ni reprimir la inducción de Tfh, ni reducir la frecuencia de LiB de CG (aunque pudimos observar una reducción leve pero no significativa) (Fig. 36). Estos experimentos resaltan una vez más las diferentes funciones de Gal-3 exógena y su contraparte endógena.

En conclusión, los resultados expuestos en esta tesis, integrados junto a reportes previos, demuestran dependencia entre la presencia de CGs espontáneos autorreactivos e IFN- γ en ratones Gal-3 KO. El bloqueo de IFN- γ limitó la inducción de CGs espontáneos, reduciendo las frecuencias de LiB de CG y Tfh y el switch de isotipo de Ig, así como también previno la aparición de autoanticuerpos e infiltrado en riñón. Estos

hallazgos demuestran y confirman una vez más que la sobreproducción de IFN- γ está íntimamente relacionada con el desarrollo de enfermedades autoinmunes de características similares al lupus. Finalmente, revelamos un nuevo rol de Gal-3 en la modulación de la respuesta inmune: Gal-3 controla la formación de CGs y la tolerancia inmunológica B. Nuestros resultados demuestran que la ausencia intrínseca de Gal-3 en los LiB favorece la formación de CGs y pone de manifiesto el potencial de esta vía para el diseño de terapias específicas en diversas enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos.

Las principales alteraciones en la respuesta inmune humoral evidenciadas en los ratones Gal-3 KO se resumen en el esquema de la figura 38.

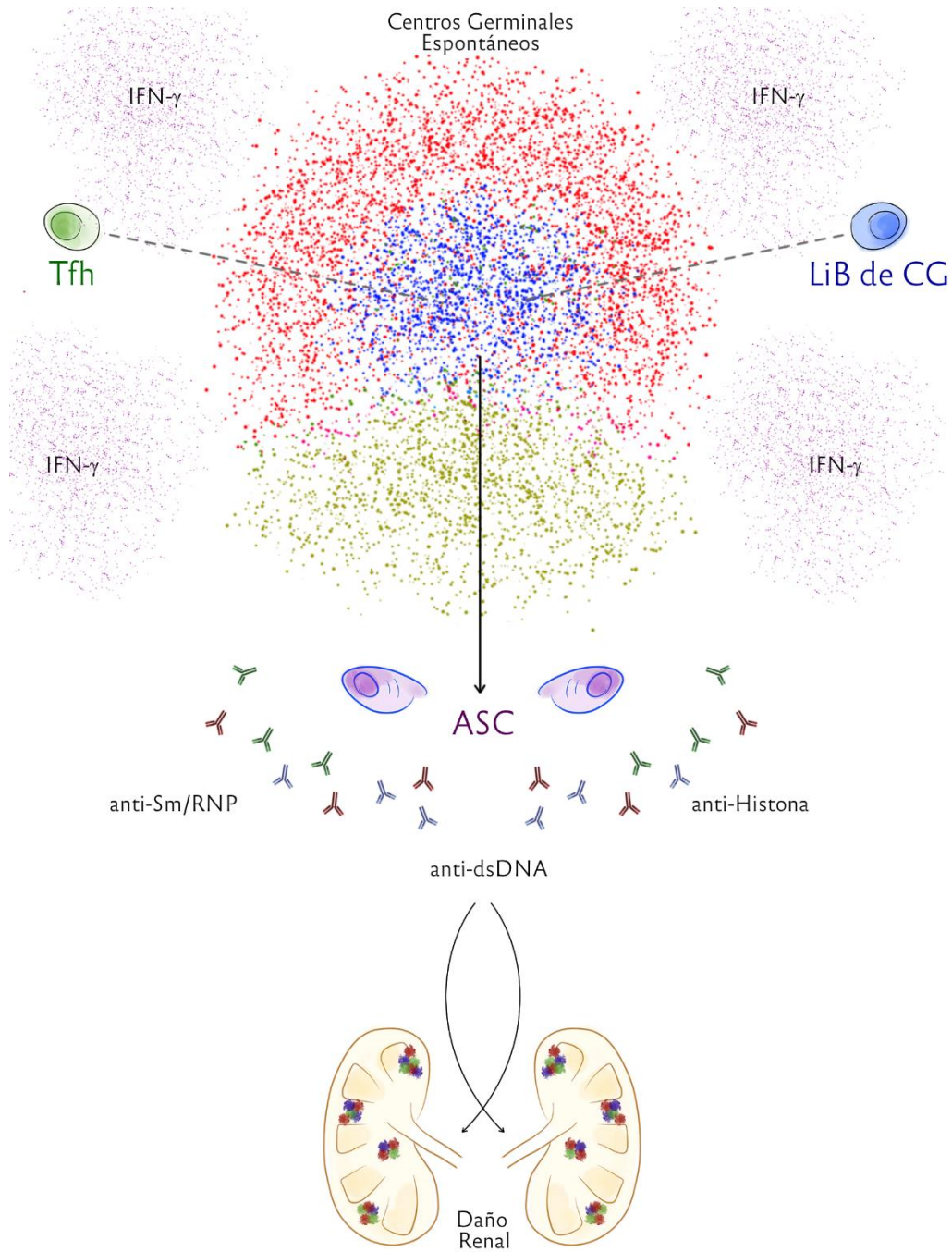


Fig. 38: Visión integral del proceso autoinmune desencadenado en ausencia de Gal-3.

En ratones deficientes en Gal-3 se evidencia formación espontánea de CGs, con un incremento tanto de LiB de CG como de Tfh, acompañado de hipergammaglobulinemia e incremento de ASC. A su vez los ratones Gal-3 KO producen excesivas cantidades de la citoquina proinflamatoria IFN- γ , la cual favorece la producción de autoanticuerpos de isotipo IgG2c e IgG3 específicos para Ags nucleares, como anti-dsDNA, anti-Sm/RNP y anti-Histona. Finalmente, en ausencia de Gal-3, los ratones desarrollan una enfermedad autoinmune de características similares al lupus, con afectación renal.

Observaciones Finales y Perspectivas a futuro

Aún quedan preguntas fundamentales por responder respecto el origen, composición, regulación, funcionamiento y mantenimiento de los CGs. Resulta imprescindible entender las diferencias devenidas de distintos escenarios de respuesta inmunológica: infecciones, autoinmunidades, cáncer, trasplantes o respuesta a microorganismos comensales de la microbiota. Cada escenario, indefectiblemente, configura un tipo de respuesta inmune mediada por CGs que es única y diversa, aunque muchas de las características de los CGs se compartan entre los diversos escenarios.

Con relación a vacunas e infecciones, estudios recientes cuestionaron los modelos clásicos canónicos de maduración de la afinidad en respuestas de CGs, en la que se predice una reducción en la diversidad clonal debido a la expansión de unos pocos clones de alta afinidad, quienes prevalecen en la competencia que despliegan frente a clones de LiB "menos aptos" de menor afinidad. Esto se observa típicamente en poblaciones de CGs provocadas por inmunizaciones con sistemas haptenes-carrier, como NP (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl) acoplado a OVA (Ovalbúmina), CCG (Chicken Gamma Globulin) o KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)^{18, 304, 305, 306}. No obstante, este tipo de reacciones no son representativas de las respuestas a Ags complejos proteicos, glicoproteicos o lipoproteicos, encontrados en muchos patógenos. Los Ags complejos provocan respuestas humorales policlonales genéticamente diversas, impulsadas por muchos y diversos epítopes dispuestos en el Ag³⁰⁷. A diferencia de las respuestas a haptenes-carrier, en las que se impulsa la maduración de la afinidad en gran medida por competencia intraclonal, las respuestas de CG a Ags complejos implican competencia intraclonal para un epítope común, así como también competencia interclonal para epítopes únicos o distintos^{11, 308, 309, 310}. A su vez un estudio documentó que la afinidad

puede aumentar en el tiempo sin reducir la diversidad del repertorio de células en los CGs en respuesta a inmunizaciones con Ags complejos como influenza hemagglutinin o anthrax protective antigen. Por lo tanto, la maduración de la afinidad no implica necesariamente una pérdida radical de diversidad, que es teleológicamente satisfactoria para un sistema que debe generar anticuerpos que son protectores no solo contra la reexposición a la misma cepa de patógeno, sino también contra otras variantes. Dos reportes realizados en prestigiosas revistas científicas en el 2016, proporcionan evidencia de que LiB de afinidades muy dispares pueden coexistir dentro del mismo CG, lo que sugiere que la selección de clones en los CGs es mucho menos estricta de lo que generalmente siempre se pensó ^{11, 308}. Mecánicamente, los factores que subyacen a esta permisividad no están claros. La constatación de que los bNAbs (anticuerpos altamente neutralizantes generados sólo por cierta fracción de individuos) para influenza, plasmodium y, más llamativamente, HIV requieren rondas de SHM y selección extensivas y no convencionales, y el curioso (e incluso desconcertante) hallazgo de que los bNAb altamente mutados (y presumiblemente ampliamente seleccionados) frecuentemente surgen de precursores de baja afinidad, ejemplifican cuánto queda por dilucidar sobre el ritmo y la rigurosidad de la selección de CGs, especialmente durante las respuestas crónicas o de larga duración ^{144, 145, 311, 312, 313}. No obstante, estos avances significan un progreso sustancial en el camino hacia el descubrimiento de vacunas efectivas contra muchas infecciones complejas, como HIV, *P. falciparum*, o *T. cruzi*.

El escenario de las respuestas autoinmunes con presencia de CGs espontáneos autorreactivos y el porqué de su origen es igual de interesante. Múltiples polimorfismos humanos asociados a autoinmunidad muestran evidencia de haber sido seleccionados durante la evolución, lo que puede reflejar una compensación entre una respuesta inmune mejorada frente a infecciones pero un riesgo mayor de autoinmunidad ^{314, 315}. Por ejemplo, el polimorfismo PTPN22R620W puede proporcionar una mayor protección contra la tuberculosis ³¹⁶, aunque también está asociado a incrementada susceptibilidad a enfermedades autoinmunes severas ^{183, 317}, incluidas LES ¹⁸⁰, Diabetes Tipo I ¹⁸¹ y Artritis

reumatoidea ¹⁸². Otro ejemplo es el polimorfismo en FCGR2B (que codifica FcγRIIB), asociados a SLE, que protege contra la infección grave por *P. falciparum* ³¹⁸.

Posiblemente al aumentar la amplitud del repertorio de LiB *naïve* y al disminuir los umbrales de activación de los LiB, las variantes genéticas asociadas con ciertas autoinmidades también faciliten respuestas rápidas de anticuerpos a patógenos y lo protejan de la infección. Resulta esencial obtener una mejor comprensión de qué mecanismos y señales están involucrados en los eventos de selección y así poder manipular la reacción de CG en estos contextos de autoinmunidad. Si bien existen indicios prometedores sobre la manipulación de CGs, aún quedan muchas preguntas por responder: ¿Pueden LiB autorreactivos mutar hacia afinidades alejadas de la autorreactividad? ¿Podrían ciertas células como las Tfh o las FDC favorecer a que un LiB autorreactivo en contextos de infección o inmunización pierda su autorreactividad y participe en respuestas de anticuerpos beneficiosas? ¿Cómo se establece la convivencia entre clones autorreactivos y clones específicos de patógenos en contextos de infección o inmunización? ¿Cómo se establece y define la maduración de la afinidad para clones autorreactivos? ¿Existen diferencias entre los programas transcripcionales de clones específicos de patógeno y clones autorreactivos? ¿Cómo impactan ciertas hormonas como el estrógeno en la regulación de los CGs y, en especial, de los CGs autorreactivos? ¿Qué cambios sufren los CGs de pacientes con enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos, como el lupus, que entran en remisión por largos períodos de tiempo, incluso décadas?

Elucidar estos interrogantes respecto CGs continúa planteando muchos desafíos tecnológicos. Sin embargo, el uso de tecnologías recientemente desarrolladas y modelos matemáticos y experimentales, continúa revelando más secretos acerca de la biología de los CGs. Existe una confianza real de que finalmente se logren estrategias para desarrollar vacunas para prevenir infecciones complejas como el HIV o malaria, así como también se logre aliviar o prevenir la producción de autoanticuerpos patogénicos que pueden impactar severamente en los órganos y tejidos de los pacientes con autoinmunidad. Las

nuevas tecnologías, entre las que se destacan: Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq), Mass cytometry (CyTOF), el uso de microscopía intravital two-photon, y las herramientas bioinformáticas mejoradas, han comenzado a abordar parte de esta complejidad. Estos enfoques de última generación pueden facilitar no sólo un mayor entendimiento de la reacción de CG sino que pueden facilitar también la identificación de vías específicas que conducen a enfermedades en pacientes individuales.

Highlights

Durante la diferenciación de un LiB a CP se produce una disminución de los niveles de Gal-3

Los ratones Gal-3 KO presentan hipergammaglobulinemia, principalmente debido a elevadas concentraciones de IgG2c e IgG3, e incrementado número de ASC

Los ratones Gal-3 KO generan CGs de forma espontánea, de arquitectura organizada y bien definida, con LiB de CG y Tfh *bonafides*

Los LiB de ratones Gal-3 KO muestran incrementada expresión de genes y de moléculas asociados a activación, coestimulación, proliferación y formación de CGs

La deficiencia intrínseca de Gal-3 en los LiB favorece la sobreproducción de Igs y conduce a la generación espontánea de CGs

Los ratones Gal-3 KO exhiben una aumentada producción de IFN- γ , principalmente debido a una sobreproducción por parte de LiT CD4⁺

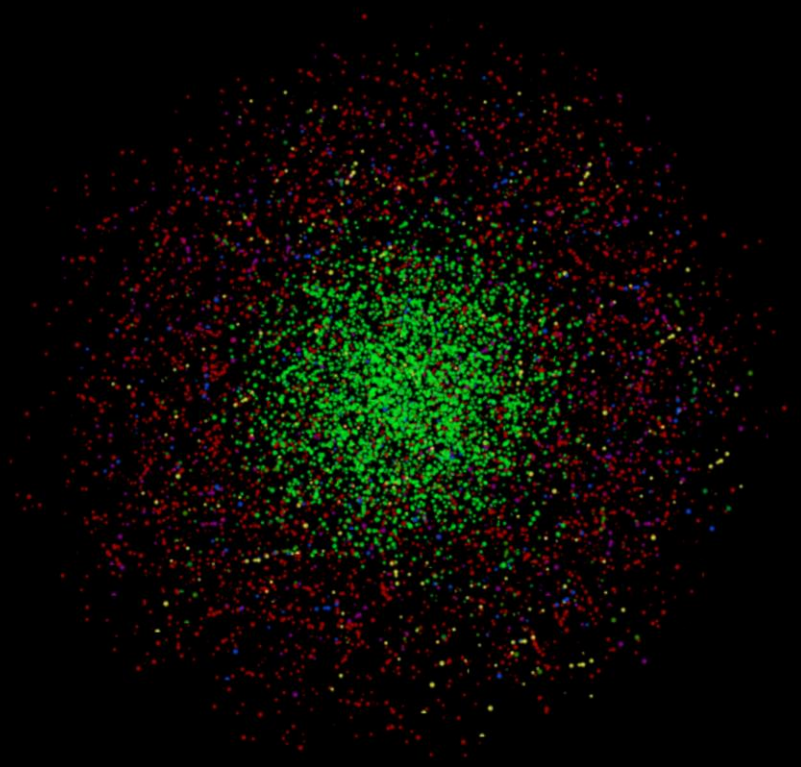
Los LiB de CG de ratones Gal-3 KO presentan una incrementada expresión de IFN- γ R y de T-bet

Los ratones Gal-3 KO de edad avanzada evidencian signos de autoinmunidad, con presencia de autoanticuerpos específicos para dsDNA, Histona y Sm/RNP y daño y disfuncionalidad renal

El bloqueo de la señalización de IFN- γ previene la inducción espontánea de LiB de CG y Tfh, el switch de isotipo, la generación de una alta frecuencia de células productoras de IFN- γ y la aparición de manifestaciones autoinmunes

El tratamiento con antibióticos de amplio espectro no modifica la inducción de CGs en los ratones Gal-3 KO

La administración exógena de Gal-3 recombinante no reprime la generación espontánea CGs



MATERIALES
Y
MÉTODOS

Materiales y Métodos

1. Tabla de Recursos Principales.
2. Animales de Experimentación.
3. Reactivos
 - a. Reactivos Químicos.
 - b. Anticuerpos neutralizantes de acción biológica.
 - c. Anticuerpos usados en Citometría de Flujo.
 - d. Anticuerpos usados en Inmunofluorescencia de Tejidos Congelados.
4. Obtención de células
 - a. Células de Bazo.
 - b. Células de Médula Ósea.
 - c. Células de Placas de Peyer.
5. Cultivos primarios y purificación de poblaciones celulares
 - a. Cultivos primarios.
 - b. Activación celular para la determinación de citoquinas intracelulares.
 - c. Purificación celular por FACS.
 - d. Cultivo de linfocitos T y evaluación de citoquinas.
 - e. Co-cultivo T-B.
6. Manipulación de ratones y tratamientos *in-vivo*
 - a. Transferencia adoptiva de células.
 - b. Generación de quimeras de Médula Ósea.
 - c. Tratamiento *in-vivo* con anticuerpos bloqueantes de IFN- γ .
 - d. Tratamiento *in-vivo* con antibióticos de amplio espectro.
 - e. Tratamiento *in-vivo* con Gal-3 recombinante.
7. Técnicas
 - a. Citometría de flujo
 - i. Determinación de proteínas y/o marcadores de Superficie.
 - ii. Determinación de citoquinas.
 - iii. Determinación de factores de transcripción.
 - b. ELISA
 - i. Cuantificación de citoquinas.
 - ii. Cuantificación de Igs.
 - c. ELISPOT.
 - d. Histología.
 - e. Inmunofluorescencia en tejidos.
 - f. Medición de auto-anticuerpos.
 - g. Microarrays.
 - h. Urea y creatinina en suero y proteínas totales en orina.
8. Análisis estadísticos.

1. Tabla de Recursos Principales

REACTIVOS	FABRICANTE	IDENTIFICADOR
Anticuerpos		
Anti-B220 FITC (RA3-6B2)	BioLegend	Cat#103206; RRID: AB_312991
Anti-B220 PE (RA3-6B2)	BioLegend	Cat#103208; RRID: AB_312993
Anti-B220 PE-Cy7 (RA3-6B2)	BioLegend	Cat#103222; RRID: AB_313005
Anti-CD3 ϵ PerCP-Cy5.5 (145-2C11)	BioLegend	Cat#100328; RRID: AB_893318
Anti-CD86 APC (GL-1)	BioLegend	Cat#105012; RRID: AB_493342
Anti-CD4 APC-Cy7 (GK1.5)	BioLegend	Cat#100414; RRID: AB_312699
Anti-CD23 FITC (B3B4)	BioLegend	Cat#101606; RRID: AB_312831
Anti-IFN- γ FITC (XMG1.2)	BioLegend	Cat#505806; RRID: AB_315400
Anti-Bcl-6 PE (7D1)	BioLegend	Cat#358504; RRID: AB_2562152
Anti-IL-21R APC (4A9)	BioLegend	Cat#131910; RRID: AB_2124133
Anti-ICOS PE-Cy7 (C398.4A)	BioLegend	Cat#313520; RRID: AB_10643411
Anti-IgD Alexa Fluor 594 (11-26c.2a)	BioLegend	Cat#405740; RRID: AB_2565572
Anti-IFN- γ R α Biotin (2E2)	BioLegend	Cat#112804; RRID: AB_2123475
Anti-NK1.1 (PK136)	BioLegend	Cat#108714; RRID: AB_389364
Anti-TCR β chain (H57-597)	BioLegend	Cat#109212; RRID: AB_313435
Anti-B220 APC (RA3-6B2)	eBioscience	Cat#17-0452-83; RRID: AB_469396
Anti-CD11b FITC (M1/70)	eBioscience	Cat#11-0112-85; RRID: AB_464936
Anti-CD21 PE (eBio8D9)	eBioscience	Cat#12-0211-82; RRID: AB_465588
Anti-PD-1 PE (J43)	eBioscience	Cat#12-9985-82; RRID: AB_466295
Anti-CD4 PE (GK1.5)	eBioscience	Cat#12-0041-82; RRID: AB_465506

Anti-CXCR4 PE (2B11)	eBioscience	Cat#12-9991-82; RRID: AB_891391
Anti-CD40 PE (1C10)	eBioscience	Cat#12-0401-82; RRID: AB_465649
Anti-CD69 PerCP-Cy5.5 (H1.2F3)	eBioscience	Cat#45-0691-82; RRID: AB_1210703
Anti-Foxp3 PerCP-Cy5.5 (FJK-16s)	eBioscience	Cat#45-5773-82; RRID: AB_914351
Anti-Foxp3 APC (FJK-16s)	eBioscience	Cat#17-5773-82; RRID: AB_469457
Anti-IFN- γ APC (XMG1.2)	eBioscience	Cat#17-7311-82; RRID: AB_469504
Anti-Ki-67 eFluor660 (SolA15)	eBioscience	Cat#50-5699-82; RRID: AB_2574237
Anti-GL7 eFluor660 (GL7)	eBioscience	Cat#50-5902-82; RRID: AB_2574252
Anti-CD39 PerCP-eFluor710 (24DMS1)	eBioscience	Cat#46-0391-82; RRID: AB_10717953
Anti-CTLA-4 PE (UC10-4B9)	eBioscience	Cat#12-1522-82; RRID: AB_465879
Anti-CD49b PE (DX5)	eBioscience	Cat#12-5971-82; RRID: AB_466073
Anti-MHC Class II I-Ab PerCP-eFluor710 (AF6-120.1)	eBioscience	Cat#46-5320-82; RRID: AB_10698173
Anti-CD11c PE-Cy7 (N418)	eBioscience	Cat#25-0114-82; RRID: AB_469590
Anti-CD11c-FITC (HL-3)	BD Biosciences	Cat#553801; RRID: AB_395060
Anti-CD45.1-APC-Cy7 (A20)	BD Biosciences	Cat#560579; RRID: AB_1727487
Anti-CD45.2-PerCP-Cy5.5 (104)	BD Biosciences	Cat#552950; RRID: AB_394528
Anti-IL-17-PE (TC11-18H10)	BD Biosciences	Cat#559502; RRID: AB_397256
Anti-Bcl-6-PE-Cy7 (K112-91)	BD Biosciences	Cat#563582
Anti-CD80-PE (16-10A1)	BD Biosciences	Cat#553769; RRID: AB_395039

Anti-CD138-APC (281-2)	BD Biosciences	Cat#558626; RRID: AB_1645216
Anti-FAS (CD95)-PE (Jo2)	BD Biosciences	Cat#554258; RRID: AB_395330
Anti-FAS (CD95)-PE-Cy7 (Jo-2)	BD Biosciences	Cat#557653; RRID: AB_396768
Anti-FAS (CD95)-Biotin (Jo2)	BD Biosciences	Cat#554256; RRID: AB_395328
Anti-CXCR5-Biotin (2G8)	BD Biosciences	Cat#551960; RRID: AB_394301
Anti-IgD FITC (11-26c.2a)	BD Biosciences	Cat#553439; RRID: AB_394859
Anti-CD38 PE (90)	BD Biosciences	Cat#553764; RRID: AB_395034
Anti-Blimp-1-PE (C-21)	Santa Cruz	Cat#sc-47732; RRID: AB_628168
Anti-CD4-Alexa Fluor 488 (RM4-5)	Invitrogen	Cat#MCD0420; RRID: AB_10373704
Anti-CD3-Alexa Fluor 647 (500A2)	Invitrogen	Cat#HM3421; RRID: AB_2536582
Anti-IgG(H+L)-Alexa Fluor 594	Invitrogen	Cat#A-11007; RRID: AB_141374
LEAF Purified anti-mouse CD3	BioLegend	Cat#100331; RRID: AB_1877073
LEAF Purified anti-mouse CD28	BioLegend	Cat#102112; RRID: AB_312877
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μ Chain	Jackson ImmunoResearch	Cat#115-006-020; RRID: AB_2338469
InVivoMAb anti-mouse IFN- γ IgG ₁	BioXCell	Cat#BE0055; RRID: AB_1107694
InVivoMAb Rat IgG ₁ Isotype control	BioXCell	Cat#BE0088; RRID: AB_1107775
Químicos y Proteínas		
Streptavidin PerCP-Cy5.5	BioLegend	Cat#405214
Streptavidin APC	BioLegend	Cat#405207
Streptavidin PE	BD Biosciences	Cat#554061
PNA-FITC	Vector Laboratories	Cat#FL-1071 RRID: AB_2315097
PNA-Alexa Fluor 647	Invitrogen	Cat#L32460
LPS-B ₅ (LPS from E. coli o55:B ₅)	Invivogen	Cat#tlrl-b5lps
Kits y Ensayos Comerciales		

Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience	Cat#00-5523-00
Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences	Cat#554714
CD43 (Ly-48) MicroBeads for isolation of resting B cells Kit	Miltenyi Biotec	Cat#130-049-801
C57BL/6 Mouse Immunoglobulin Panel	SouthernBiotech	Cat#5300-01B
Mouse IgM-UNLB	SouthernBiotech	Cat#0101-01
Mouse IgM-BIOT	SouthernBiotech	Cat#0101-08
Mouse IgG-UNLB	SouthernBiotech	Cat#0107-01
Mouse IgG-BIOT	SouthernBiotech	Cat#0107-08
Mouse IgG1-UNLB	SouthernBiotech	Cat#0102-01
Mouse IgG1-BIOT	SouthernBiotech	Cat#0102-08
Mouse IgG2a-UNLB	SouthernBiotech	Cat#0103-01
Mouse IgG2a-BIOT	SouthernBiotech	Cat#0103-08
Mouse IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	Cat#88-7314-77; RRID: AB_2575068
Mouse IL-21 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	Cat#88-8210-88; RRID: AB_2575192
Mouse IL-4 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	Cat#88-7044-77; RRID: AB_2574968
Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	Cat#88-7064-88; RRID: AB_2574990
Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	Cat#88-7024-77; RRID: AB_2574949
HEp-2 ANA Kits/Substrate Slides	Biocientífica S.A.	Cat#NT00-12
Crithidia luciliae/Substrate Slides	Biocientífica S.A.	Cat#NF06-70
Metronidazole Analytical Standard	Sigma-Aldrich	Cat#M3761-25G
Neomycin Trisulfate Salt Hydrate	Sigma-Aldrich	Cat#N6386-25G

Vancomycin Hydrochloride from Streptomyces Orientalis	Sigma-Aldrich	Cat#V1130-1G
Calf thymus dsDNA	Sigma-Aldrich	Cat#D1501-100MG
Sm/RNP	Arotec Diagnostic Limited	Cat#ATRo1-10
Histone	Arotec Diagnostic Limited	Cat# ATHo1-02
Modelos Experimentales: Organismos/Cepas		
Ratón: C57BL/6J	The Jackson Laboratory	JAX:000664
Ratón: Lgals3tm1Poi/J	The Jackson Laboratory	JAX:006338
Ratón: B6.SJL-Ptprca Pepcb/Boy	The Jackson Laboratory	JAX:002014
Ratón: B6.129S2-Ighmtm1Cgn/J	The Jackson Laboratory	JAX:002288
Softwares y Algoritmos		
FlowJo software	Tree Star	N/A
GraphPad Prism 6	GraphPad Software	N/A
R	R Development Core Team	N/A
ImageJ	NIH	N/A

2. Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones hembras principalmente de 8-10 semanas de edad, excepto en casos particulares en los que se emplearon ratones de 3 semanas y 8 meses de edad, indicados oportunamente. Los animales fueron alojados, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, en las instalaciones del Bioterio del CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad

Nacional de Córdoba. El uso de animales de experimentación fue aprobado y conducido de acuerdo con las guías del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicadas por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales y aprobada por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (resolución HCD 274/09 y 981/13).

Se utilizaron las siguientes cepas de ratones:

- **WT (C57BL/6J)**, adquiridos en el Servicio de Animales de Laboratorio, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata y obtenidos originalmente en The Jackson Laboratories, USA.
- **Gal-3 KO (B6.Cg-Lgals3tm1Poi/J)**, provistos por el Dr. Oscar Campetella (IIB- INTECH- UNSAM) y obtenidos originalmente en The Jackson Laboratories, USA. Esta cepa de ratones homocigotas posee una mutación dirigida a la secuencia que codifica para Gal-3, provocando la falta de expresión de la mencionada proteína. Estos ratones originalmente fueron donados por Françoise Poirier (CNRS-Université Paris Diderot) a The Jackson Laboratories.
- **C57BL/6J CD45.1 (B6.SJL-Ptprca Pepcb/Boy)**, adquiridos en The Jackson Laboratories, USA. Esta cepa congénita C57BL/6J se utiliza ampliamente en estudios que involucran trasplantes porque posee una marca diferencial en el marcador panleucocitario *Ptprca*, comúnmente conocido como CD45.1 o Ly5.1. Las células de estos ratones son completamente funcionales y su comportamiento es comparable al de los animales WT.
- **μMT (B6.129S2-Ighmtm1Cgn/J)**, adquiridos en The Jackson Laboratories, USA. Son ratones mutantes homocigotas que carecen de linfocitos B maduros y tienen el *background* genético C57BL/6. El defecto genético lleva a una falta de expresión de IgM en la membrana celular. Estos ratones originalmente fueron donados por Klaus Rajewsky a The Jackson Laboratories.

3. Reactivos

a. Reactivos Químicos.

Se utilizaron: medio de cultivo RPMI 1640, Buffer Fosfato (PBS) pH 7.4, L-glutamina (Glutamax), Ácido Etildiaminoetraacético (EDTA) y 2-Mercaptoetanol obtenidos en Life Technologies (USA); Suero Bovino Fetal (SBF) adquirido en Natocor (Argentina); Gentamicina obtenida en FABRA (USA); Lysis Buffer (Tris-Cloruro de Amonio), Azul de Tripán, Albúmina Sérica Bovina, Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e Ionomicina adquiridos en Sigma-Aldrich

Chemical Co (USA); Heparina libre de aditivos de 5.000 U/ml obtenida en UENFAR (Alemania); Fijador Histológico obtenido en BioPure Diagnostics (Argentina); 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) obtenido en BD Biosciences (USA); CRYOPLAST® (Medio de Montaje para congelación) obtenido en Biopack (Argentina), Solución Fisiológica de Cloruro de Sodio obtenida en B. Braun (Argentina).

Para las determinaciones de proteínas intracelulares (citoquinas y factores de transcripción) se utilizaron: Brefeldina A, Monensina y kit "Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set" adquiridos en eBioscience (USA); kit "Fixation/Permeabilization Solution Kit" adquirido en BD Biosciences (USA); LPS adquirido en Invivogen (USA).

Para determinaciones por inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes reactivos: Streptavidin-PerCP-Cy5.5 y Streptavidin-APC obtenidas en BioLegend (USA); Streptavidin-PE obtenida en BD Biosciences (USA); PNA-FITC obtenida en Vector Laboratories (USA) y PNA-Alexa Fluor 647 obtenida en Invitrogen (USA).

Los restantes químicos usados fueron: Ácido Sulfúrico, Etanol, Formaldehído, Metanol, Acetona, TRIS, Cloruro de Sodio, Glucosa, Hematoxilina y Eosina obtenidos en Cicarelli (Argentina), Taurus (Argentina), J.T.Backer Chemicals (USA) y Anedra (Nueva Zelanda), todos de grado analítico.

Para tratamientos antimicrobianos se utilizó: Metronidazole Analytical Standard, Neomycin Trisulfate Salt Hydrate y Vancomycin Hydrochloride from Streptomyces Orientalis adquiridos en Sigma-Aldrich (USA).

b. Anticuerpos neutralizantes de acción biológica.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos para tratamientos in-vivo: InVivoMAb anti-mouse IFN- γ ; Clone: XMG1.2, Isotype: Rat IgG1, Cat#:BE0055 (BioXCell) e InVivoMAb Rat IgG1 Isotype control; anti Horseradish Peroxidase, Clone: HRPN, Isotype: Rat IgG1, Cat#:BE0088 (BioXCell).

c. Anticuerpos usados en Citometría de Flujo.

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en Citometría de Flujo: B220-FITC (RA3-6B2), B220-PE (RA3-6B2), B220-PE-Cy7 (RA3-6B2), CD3-PerCP-Cy5.5 (145-2C11), CD86-APC (GL-1), CD4-APC-Cy7 (GK1.5), CD23-FITC (B3B4), IFN- γ -FITC (XMG1.2), Bcl-6-PE (7D1), IL-21R-APC (4A9), ICOS-PE-Cy7 (C398.4A) e IFN- γ R α -Biotin (2E2) obtenidos en BioLegend (USA);

B220-APC (RA3-6B2), CD11b-FITC (M1/70), CD21-PE (eBio8D9), PD-1-PE (J43), CD4-PE (GK1.5), CXCR4-PE (2B11), CD40-PE (1C10), CD69-PerCP-Cy5.5 (H1.2F3), Foxp3-PerCP-Cy5.5 (FJK-16s), Foxp3-APC (FJK-16s), IFN- γ -APC (XMG1.2), Ki-67-eFluor660 (SolA15), GL7-eFluor660 (GL7), CD11c PE-Cy7 (N418), MHC Class II I-Ab PerCP-eFluor710 (AF6-120.1), CD49b PE (DX5), CTLA-4 PE (UC10-4B9) y CD39 PerCP-eFluor710 (24DMS1) obtenidos en eBioscience (USA); CD11c-FITC (HL-3), CD45.1-APC-Cy7 (A20), CD45.2-PerCP-Cy5.5 (104), IL-17-PE (TC11-18H10), Bcl-6-PE-Cy7 (K112-91), CD80-PE (16-10A1), CD138-APC (281-2), FAS (CD95)-PE (Jo2), FAS (CD95)-PE-Cy7 (Jo-2), FAS-Biotin (Jo2), CXCR5-Biotin (2G8), IgD FITC (11-26c.2a) y CD38 PE (90) obtenidos en BD Biosciences (USA); y Blimp-1-PE (C-21) obtenido en Santa Cruz (USA).

d. Anticuerpos usados en Inmunofluorescencia de Tejidos Congelados.

Los siguientes anticuerpos y reactivos fueron utilizados para Inmunofluorescencia de tejidos congelados: PNA-FITC (Vector Laboratories), PNA-Alexa Fluor 647 (Invitrogen), CD4-Alexa Fluor 488 (RM4-5), CD3-Alexa Fluor 647 (500A2) e IgG(H+L)-Alexa Fluor 594 obtenidos en Invitrogen (USA); IgD-Alexa Fluor 594 (11-26c.2a) obtenido en BioLegend (USA), B220-PE (RA3-6B2) y B220-APC (RA3-6B2) obtenidos en eBioscience (USA).

4. Obtención de Células

a. Células de Bazo.

Los bazos fueron colocados sobre mallas metálicas de acero inoxidable alojadas dentro de cápsulas de Petri de 30 mm conteniendo 3 ml de Solución Fisiológica al 2% SBF (SF-2%SBF) en completa esterilidad. Los órganos fueron disgregados mecánicamente utilizando émbolos estériles. La suspensión celular obtenida fue centrifugada y el pellet se trató por 5 min con 1 ml de buffer de lisis para producir la lisis de los glóbulos rojos. Luego las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min y lavadas con SF-2%SBF. Finalmente, las células fueron resuspendidas en SF-2%SBF y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La cantidad de leucocitos viables fue determinada por cuantificación en cámara de Neubauer, mediante la utilización de colorante vital Azul de Tripán.

b. *Células de Médula Ósea.*

Se aislaron, en esterilidad, fémures y tibias de ratones manteniendo la integridad de las epífisis. Los huesos fueron separados cortando en el extremo superior los ligamentos que unen fémur-cadera y en el extremo inferior cortando por debajo de la articulación del tobillo. Los huesos fueron separados de los músculos y otros tejidos colindantes mediante el uso de tijeras, fórceps y escalpelos y conservados en SF-2%SBF hasta el momento del procesamiento. Posteriormente, fueron separados fémures de tibias y retiradas las epífisis de cada hueso. Se insertó una aguja de 25 G (5/8") a través del extremo cortado y se recolectó el interior medular lavando con 5 ml de SF-2%SBF por hueso. Las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min y lavadas 2 veces con SF-2%SBF. Finalmente, las células fueron resuspendidas en SF-2%SBF y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La cantidad de leucocitos viables fue determinada por cuantificación en cámara de Neubauer, mediante la utilización de colorante vital Azul de Tripán.

c. *Células de Placas de Peyer.*

Se obtuvieron secciones de intestino delgado cortando 0,5 cm por debajo del estómago y 1 cm por encima del ciego. Se removieron la grasa, los nódulos linfáticos mesentéricos y los tejidos adyacentes. La materia fecal fue expulsada desplazando suavemente con tijeras curvas planas a lo largo de la longitud del fragmento del intestino, evitando romperlo. Las placas de Peyer (PP) fueron visualizadas como pequeños nódulos blanquecinos sobresalientes de 1-2 mm de diámetro aprox. (5-6 PP por sección) y se retiraron las mismas cortando con tijeras curvas planas la sección correspondiente, evitando extraer la pared intestinal circundante. Inmediatamente después de la extirpación, las PP se colocaron en RPMI completo. Las PP fueron disgregadas mecánicamente utilizando émbolos estériles. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 2000 rpm por 5 min y lavadas con RPMI suplementado. Finalmente, las células fueron resuspendidas en RPMI suplementado y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La cantidad de leucocitos viables fue determinada por cuantificación en cámara de Neubauer, mediante la utilización de colorante vital Azul de Tripán.

5. Cultivos Primarios y Purificación de Poblaciones Celulares

a. Cultivos primarios.

Las suspensiones celulares fueron centrifugadas y resuspendidas en RPMI completo (RPMI al 10% de SBF, 2 mM de L-glutamina, 50 μ M 2-ME y 40 μ g/ml de gentamicina). Según las particularidades de cada experimento, las células se cultivaron a diferentes tiempos, en medio solo o en presencia de distintos estímulos. Los cultivos se hicieron a una atmósfera constante de 5% de CO₂ y 37 °C.

b. Estimulación de células para la determinación de citoquinas intracelulares.

Células de diferentes órganos (2×10^6) fueron cultivadas en placas de 96 reservorios con fondo en U, durante 5h, con PMA (50 ng/ml); Ionomicina (500 ng/mL), Brefeldina A (1/1000) o Monensina (1/1000). En algunos experimentos, linfocitos B (2×10^6) fueron cultivados en placas de 96 reservorios con fondo en U, en presencia o ausencia de LPS (5 μ g/mL) a diferentes tiempos (12, 24, 48 y 72 h).

c. Purificación celular por FACS.

Las purificaciones celulares fueron llevadas a cabo siguiendo los principios de la separación "Fluorescence-activated cell sorting", utilizando en todos los casos un cell sorter FACSAria II (BD Biosciences). En todos los casos se trabajó con una pureza de la población celular superior al 95%, y la viabilidad de las células obtenidas, determinada por exclusión con Azul de Tripán, fue superior al 97%.

Para los ensayos de cuantificación de citoquinas secretadas por células T CD4⁺ en sobrenadantes de cultivos, suspensiones celulares de bazo fueron teñidas con anti-CD3, anti-CD4 y anti-B220. Posteriormente, las células CD3⁺CD4⁺B220⁻ fueron seleccionadas y aisladas.

Para los ensayos de cuantificación de Igs secretadas por células B en experimentos de co-cultivo T-B, suspensiones celulares de bazo fueron teñidas con anti-CD4, anti-B220 y anti-GL7. Posteriormente, las células B naïve (B220⁺CD4⁻GL7⁻) y las células T naïve (CD4⁺B220⁻GL7⁻) fueron seleccionadas y aisladas.

Para los ensayos de transferencia adoptiva de células B, suspensiones celulares de bazo fueron teñidas con anti-B220, anti-CD3, anti-CD4 y anti-GL7. Posteriormente, las células B totales (B220⁺CD3⁻CD4⁻) o células B naïve (B220⁺CD4⁻GL7⁻) fueron seleccionadas y aisladas

Para el estudio de expresión de genes en células B, suspensiones celulares de bazo fueron teñidas con anti-B220 y anti-CD4. Posteriormente, las células B (B220⁺ CD4⁻) fueron seleccionadas y aisladas.

d. *Cultivo de linfocitos T y posterior evaluación de citoquinas.*

Linfocitos T CD4⁺ esplénicos, obtenidos por FACS fueron cultivados con anti-CD3 y anti-CD28 por 72h. Los sobrenadantes de cultivos fueron obtenidos y la concentración de IFN- γ , IL-21, IL-4, IL-6 se determinó por la técnica de ELISA (*Ready-SET-Go!*, eBioscience).

e. *Co-cultivo T-B.*

Linfocitos T naïve CD4⁺B220⁻GL7⁻ (1.10^5) de ratones WT o Gal-3 KO fueron co-cultivados con linfocitos B naïve B220⁺CD4⁻GL7⁻ (1.10^5) de ratones WT o Gal-3 KO en placas de 96 wells, en presencia de anti-CD3 soluble (2 μ g/ml; BioLegend) y anti-IgM (5 μ g/ml; Jackson Immunoresearch). Luego de 6 días de cultivo, las concentraciones de Igs en sobrenadantes de cultivos se determinaron por ELISA.

6. Manipulación de Ratones y Tratamientos *In-Vivo*

a. *Transferencia adoptiva.*

Linfocitos B sorteados de ratones WT CD45.2 o Gal-3 KO CD45.2 fueron transferidos, por vía intravenosa, a ratones receptores. Se transfirieron 2×10^7 cél/ratón cuando los receptores fueron ratones μ MT y 6×10^7 cél/ratón cuando los receptores fueron ratones WT CD45.1. Se obtuvieron los sueros de los ratones receptores y se determinaron las concentraciones de IgG2c e IgG3, luego de 2 semanas post-transferencia adoptiva de los linfocitos B.

b. *Generación de quimeras de Médula Ósea.*

Para la generación de ratones quimeras, mostrados en la Fig. 14-15, ratones C57BL/6J WT fueron irradiados letalmente con 100 Gy y reconstituidos con 10×10^6 de células totales de MO por inyección intravenosa, con una combinación 80:20 de células donantes B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J (μ MT) y C57BL/6 (WT) o B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J (μ MT) y B6.Cg-Lgals3^{tm1Poi}/J (Gal-3 KO),

respectivamente. Para la generación de las quimeras mostradas en la Fig. 16, ratones C57BL/6J CD45.2 WT fueron irradiados letalmente con 100 Gy y reconstituidos con 10×10^6 de células totales de MO por inyección intravenosa, con una combinación 70:30 de células donantes CD45.1 C57BL/6 (CD45.1- Gal-3+/+) y B6.Cg-Lgals3^{tm1Poi}/J (Gal-3 KO), respectivamente. Los experimentos en todos los grupos de ratones quimeras de MOs fueron efectuados a las 8-10 semanas post-transferencia para garantizar la reconstitución celular. La proporción de células de MO usadas en cada diseño de quimeras (80:20 y 70:30) fue establecida en base a la proliferación inherente a cada genotipo de ratón, de modo tal que, transcurridos las 8-10 semanas post-transferencia, estén representadas con iguales frecuencias las células totales de cada ratón donante.

c. *Tratamiento in-vivo con anticuerpos bloqueantes de IFN- γ*

Ratones Gal-3 KO fueron inyectados por vía intraperitoneal con 500 μ g de anti-IFN- γ monoclonal (BioXCell, clone: XMG 1.2) o con 500 μ g rat IgG1 Isotype control mAb (BioXcell) cada 3 días durante 3 semanas.

d. *Tratamiento in-vivo con antibióticos de amplio espectro.*

Ratones WT y Gal-3 KO fueron tratados durante 5 semanas con una combinación de antibióticos de amplio espectro disueltos en el agua de bebida en las siguientes concentraciones: Vancomycin: 0.5 g/ml; Neomycin sulfate: 1 g/ml; Metronidazole: 1 g/ml. El agua estuvo disponible ad-libitum.

e. *Tratamiento in-vivo con Gal-3 recombinante.*

La Gal-3 recombinante se obtuvo del laboratorio del Dr. Oscar Campetella (IIB, UNSAM, Argentina). Brevemente, Gal-3 recombinante fue obtenida por *synthetic gene construction* (Genscript, Piscataway, NJ). Las condiciones de expresión de la proteína y las purificaciones por lactosyl-Sepharose (Sigma), seguidas por la inmovilización por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), se describen en profundidad en los trabajos publicados por Campetella O^{319, 320}. La actividad de Gal-3 como lectina fue testada por ensayos de hemaglutinación. Ratones Gal-3 KO de 12 semanas de edad fueron inyectados intraperitonealmente con PBS (control) o con Gal-3 recombinante a diferentes dosis: 12 μ g en dosis única; 24 μ g en dosis única y 24 μ g en dos dosis). Los bazoos fueron colectados 6 días luego del tratamiento para su análisis.

7. Técnicas

a. Citometría de flujo.

i. Determinación de proteínas y/o marcadores de Superficie.

Para la determinación de moléculas en la superficie celular, las suspensiones celulares (2×10^6 cél/well) fueron incubadas con diferentes mezclas de anticuerpos (25 μ l/well) unidos a fluorocromos en buffer FACS (SF-2% SBF) durante 25 min a 4° C, a excepción de la marcación con CXCR5-Biotin, el cual se efectuó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas y centrifugadas 5 min a 2000 rpm. Finalmente, las células fueron resuspendidas, adquiridas en un lapso menor a 12 h en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo (TreeStar).

ii. Determinación de citoquinas.

Para la determinación de citoquinas intracelulares, las suspensiones celulares (2×10^6 cél/well) fueron estimuladas durante 5 h con 50 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) y 500 ng/ml Ionomycin en presencia de inhibidores del transporte vesicular (Brefeldina A y/o Monensina, según corresponda). Luego, las células fueron obtenidas, lavadas y fijadas y permeabilizadas utilizando el kit comercial Fixation/Permeabilization Solution (BD Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante. Por último, las células fueron teñidas con anticuerpos específicos para citoquinas durante 30 min a temperatura ambiente, luego lavadas, resuspendidas y adquiridas en el citómetro.

iii. Determinación de factores de transcripción.

Para la determinación de factores de transcripción, las suspensiones celulares (2×10^6 cél/well) fueron teñidas para detectar sus moléculas de superficie como fue descrito anteriormente. A continuación, las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando el kit comercial Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience), siguiendo las indicaciones del fabricante. Por último, las células fueron teñidas con anticuerpos específicos para factores de transcripción

durante 30 min a temperatura ambiente, luego lavadas, resuspendidas y adquiridas en el citómetro.

b. ELISA

i. Cuantificación de citoquinas.

La cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo o suero fue realizada utilizando kits de ELISA comerciales (Ready-SET-Go!, eBioscience), según especificaciones del fabricante. Brevemente, placas de 96 wells *high binding* fueron sensibilizadas a 4°C durante la noche con 25 ul de una dilución del Ac de captura en el buffer de sensibilización apropiado para cada analito (buffer carbonato pH 9,6; buffer fosfato pH 9; o PBS pH 7,2). Posteriormente y luego de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, las placas fueron bloqueadas con 100 ul PBS al 10% de SBF durante 2 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Luego, el buffer fue descartado y la placa fue lavada 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, 25 ul de las muestras (puras o diluidas) y de diluciones seriadas del testigo fueron sembradas sobre la placa e incubadas durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Seguidamente, las placas fueron lavadas 5 veces e incubadas 1,5 h a temperatura ambiente con 25 ul de Ac secundario conjugado a biotina diluido en buffer de bloqueo. Posterior a 5 nuevos lavados, 25 ul de estreptavidina conjugada a peroxidasa fueron agregados e incubados 25 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con 40 ul de TMB (BD Biosciences), conteniendo el sustrato de la enzima y el cromógeno. Entre 5-30 min luego de la incubación, la reacción se inactivó con ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas.

ii. Cuantificación de Igs.

Para la determinación de los distintos isotipos de Igs totales, placas de 96 pocillos *high binding* fueron sensibilizadas a 4°C durante la noche con 25 ul del Ac específico para cada isotipo de Ig (IgM, IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3), a una concentración de 10 µg/ml, en buffer carbonato pH 9,6 (IgM) o buffer PBS pH 7,2 (IgGs). Posteriormente y luego de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, las placas fueron bloqueadas con 100 ul PBS al 1% de Albúmina Sérica Bovina durante 1 h a 37 °C, en cámara húmeda. Luego, el buffer fue descartado y la placa fue lavada 3 veces con

PBS-Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, 25 ul de las muestras (puras o diluidas) y de diluciones seriadas del testigo fueron sembradas sobre la placa e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Seguidamente, las placas fueron lavadas 5 veces e incubadas 1,5 h a temperatura ambiente con 25 ul de Ac secundario conjugado a biotina diluido en buffer de bloqueo. Posterior a 5 nuevos lavados, 25 ul de estreptavidina conjugada a peroxidasa fueron agregados e incubados 25 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con 40 ul de TMB (BD Biosciences), conteniendo el sustrato de la enzima y el cromógeno. Entre 5-30 min luego de la incubación, la reacción se inactivó con ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas. La concentración de cada isotipo fue determinada utilizando como referencia curvas de trabajo realizadas con estándares de cada isotipo de Ig.

c. *ELISPOT*.

Para evaluar la frecuencia de células secretantes de Acs IgM e IgG, placas de 96 pocillos (Millipore) fueron pre-sensibilizadas con etanol al 35% en agua MiliQ durante 15 segundos, y lavadas 3 veces con PBS estéril. Luego las placas fueron sensibilizadas con Acs específicos contra IgM e IgG (Southern Biotech) e incubadas durante 15-20 horas a 4°C. Las placas fueron lavadas y bloqueadas con medio RPMI 1640 completo durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, las distintas poblaciones celulares fueron agregadas a los reservorios de la placa e incubadas durante 18 horas a 37°C 5% CO₂. Seguidamente las placas fueron lavadas con PBS- Tween 20 0,05%, e incubadas con Acs marcados con biotina que reconocen epítopes distintos a los reconocidos en IgM e IgG por los Acs de sensibilización. Luego de una incubación de 2 horas a 37°C, las placas fueron lavadas e incubadas con Streptavidin marcada con Fosfatasa Alcalina durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las placas fueron lavadas y reveladas agregando 5-bromo-4-cloro-3-Indolfosfato y nitroazul de tetrazolio (BCIP-NBT) (Sigma-Aldrich). Luego de 5 minutos las placas fueron lavadas con agua corriente fría. Los spots o puntos fueron contados en un estereoscopio o lupa. Los resultados fueron informados como número de células productoras de IgM o IgG (número de puntos) por cada millón de células B.

d. *Histología.*

Los riñones fueron extraídos de ratones WT o Gal-3 KO y fijados en formol al 10%. Posteriormente se los embebió en parafina y se efectuaron cortes de 10 μm . Las secciones fueron posteriormente desparafinadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital Carl Zeiss Microimaging GmbH, con el software Moticam 2000.

e. *Inmunofluorescencia de tejidos congelados*

Bazos de ratones WT o Gal-3 KO fueron colectados y congelados inmediatamente en N_2 líquido. Se efectuaron tacos por congelación con OCT y se obtuvieron criosecciones de 7 μm de espesor. Las secciones fueron fijadas en acetona durante 10 min a -20°C y secadas a temperatura ambiente durante 10 min y luego rehidratadas en buffer TRIS y bloqueadas durante 30 min a temperatura ambiente con TRIS-10% suero normal de ratón. Posteriormente, las secciones fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda con diferentes combinaciones de anticuerpos unidos a fluorocromos en buffer TRIS. Finalmente, las secciones fueron montadas con FluorSave (Merck Millipore) y observadas bajo microscopio confocal Olympus FV1000. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop.

f. *Medición de auto-anticuerpos.*

La determinación de auto-anticuerpos en suero de ratones WT y Gal-3 de edad avanzada se efectuó una Inmunofluorescencia indirecta utilizando improntas comerciales con células HEp-2 fijadas (Biocientífica S.A.) las cuales permiten detectar anticuerpos específicos para antígenos nucleares. Las improntas HEp-2 fueron incubadas con 20 μl de una dilución 1/40 de los sueros durante 45 min, seguido por una incubación con 20 μl de anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 594. Las improntas fueron observadas bajo microscopio confocal Olympus FV1000. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop.

g. *Microarrays.*

Para el análisis de la expresión de genes, linfocitos B sorteados de ratones WT y Gal-3 KO fueron lisados con TRIzol y el ARN total fue extraído mediante el uso de RNAeasy Mini Kit (Qiagen). Los experimentos de microarray fueron efectuados con un GeneChip Mouse Gene 2.1 ST arrays (Affymetrix). Las bibliotecas de trabajo se crearon filtrando las sondas con detección de *P* values

<0.05 para todos los chips y descartando las sondas solapadas. Cada conjunto de datos se derivó a partir de dos replicados biológicos independientes. Se compararon muestras independientes calculando las proporciones de incremento y se filtraron con un umbral de 1.2 veces para los análisis. Los mapas de calor se generaron utilizando el programa de interfaz web Matrix2png. Los datos de microarrays están disponibles en la base de datos ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) con el número de registro E-MTAB-6053.

h. Urea y creatinina en suero y proteínas totales en orina.

Las concentraciones de urea y creatinina en suero fueron determinadas en un autoanalizador Dimension RxL Max system (método enzimático/colorimétrico y reacción de Jaffé, respectivamente; Siemens Healthcare Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de orina de 24h fueron colectadas mediante el uso de cajas metabólicas construidas en el laboratorio del grupo. Las proteínas totales en orina fueron determinadas en un autoanalizador Dimension RxL Max system (método colorimétrico; Siemens Healthcare Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6. Según el tipo de comparaciones y el diseño experimental, se utilizaron los análisis t de Student (para muestras apareadas o muestras desapareadas, según el caso) o ANOVA de una vía seguidos del post test Bonferroni.

Glosario

Li B₁

Subconjunto de LiB maduros con capacidad de autorrenovación que predomina en las cavidades peritoneal y pleural. Los Li B₁ reconocen componentes propios, así como también Ags bacterianos comunes, y son los principales responsables de la producción de anticuerpos naturales IgM.

Li B₂

Principal población de LiB convencionales en humanos y ratones. Pertenecen a este grupo LiB Foliculares y LiB de Zona Marginal. Surgen de precursores de médula ósea.

Afinidad

Fuerza de la interacción entre un Ag y un anticuerpo. Está influenciada por el pH y la temperatura.

Avidez

Fuerza global del complejo Ag-anticuerpo. Depende de la afinidad, de la valencia del anticuerpo y del Ag, y de las disposiciones estructurales de las partes que interactúan.

Inmunocomplejos

Complejos agregados formados a partir de la unión de varios anticuerpos a un Ag que puede existir como una unidad solitaria y/o que puede multimerizarse adicionalmente

para inducir la función efectora del anticuerpo.

Activación de LiB extrafoliculares

En respuesta a un estímulo infeccioso, la señalización a través del BCR induce la rápida división y diferenciación de LiB en plasmoblastos de corta vida secretantes de anticuerpos, en el borde de pulpa roja- Zona T. Esta respuesta extrafolicular puede ocurrir de manera T-independiente o T-dependiente, y es la fuente predominante de anticuerpos protectores que se generan temprano durante una infección.

Centro germinal (CG)

Microambiente linfoide altamente especializado y dinámico en el cual los LiB activados ciclan entre zonas anatómicamente distintas (zonas oscura y clara) a medida que se someten a rondas iterativas de selección basada en su afinidad por un Ag. Es el sitio principal de maduración de LiB, y conduce a la generación de LiB de memoria y células plasmáticas capaces de producir anticuerpos de alta afinidad.

LiB de zona oscura

LiB proliferantes de CG localizados en la zona oscura. En este compartimento los LiB experimentan hipermutación somática.

LiB de zona clara

LiB correspondientes a la progenie de LiB de zona oscura. Estas células deben seleccionarse en función de su afinidad por el Ag (seguida de la interacción con los complejos inmunes que están asociados a las FDCs) y de su capacidad para interactuar con células Tfh. Luego de alojarse en este compartimento, un LiB de CG migra hacia la zona oscura, o bien se diferencia a célula plasmática o a LiB de memoria.

Hipermutación Somática (SHM)

Proceso por el cual se introducen mutaciones puntuales en los segmentos de genes de cadenas variables (pesadas o livianas) de inmunoglobulinas, el cual puede alterar la afinidad o especificidad para un Ag. Depende de la acción de la enzima AID y conduce a la maduración de la afinidad.

Switch de Isotipo (CSR)

Mecanismo que provoca que un LiB cambie de un isotipo de Ig por otro, desde IgM a IgG, IgA o IgE. Durante este proceso se cambia la porción correspondiente a la región constante de la cadena pesada de la Ig, pero la región variable permanece sin cambios. Puesto que ésta no cambia, esta conmutación no afecta a la especificidad de antígeno. En lugar de ello, el anticuerpo conserva su afinidad por los mismos antígenos, pudiendo sin embargo interactuar con diferentes moléculas efectoras. Depende de la acción de la enzima AID.

Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID)

Enzima que deamina las citidinas presentes en el ADN y que conducen a la formación de pares U:G, que se convierten en objetivos de la maquinaria de reparación. AID es fundamental para que se produzca SHM y CSR.

Maduración de la Afinidad

Proceso mediante el cual los LiB producen progresivamente anticuerpos de mayor afinidad por el Ag durante el curso de una respuesta inmune. Con exposiciones repetidas al mismo Ag, un huésped producirá anticuerpos de afinidades sucesivamente mayores.

LiB de memoria

LiB específicos de Ag que expresan anticuerpos de alta afinidad. Tienen el potencial de generar rápidamente CG secundarios y diferenciarse a células plasmáticas frente a una re-exposición antigénica.

Plasmoblastos

Células secretantes de anticuerpos con capacidad mitótica y migratoria. Estas células pueden madurar aún más y diferenciarse a células plasmáticas.

Células Plasmáticas

Células B quiescentes terminalmente diferenciadas que se desarrollan a partir de plasmoblastos y se caracterizan por su capacidad de secretar grandes cantidades de anticuerpos. No pueden dividirse ni migrar.

Células Secretantes de Anticuerpos (ASCs)

Incluye tanto a plasmoblastos proliferantes como a células plasmáticas no proliferantes. El término se usa cuando ambos tipos de células pueden estar presentes.

B cell lymphoma 6 (BCL-6)

Represor transcripcional y regulador principal de la reacción de CG, factor de transcripción maestro del linaje Tfh. Junto con cofactores, Bcl-6 reprime los genes implicados en la activación de LiB, la regulación negativa del ciclo celular, la respuesta al estrés genotóxico y la diferenciación a LiB de memoria y a células plasmáticas.

Linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh)

Subconjunto especializado de LiT CD4+ Bcl-6+ CXCR5+ activados por Ag fundamentales para las respuestas inmunes humorales. Los Tfh son esenciales para la formación de CGs, regulan la activación y función de los LiB y efectúan la selección de LiB de CG dentro de la zona clara del CG.

Linfocitos T regulatorios foliculares (Tfr)

Subconjunto de LiT regulatorios (Treg) que co-opta la maquinaria transcripcional de los Tfh migrar hacia los CGs, donde pueden restringir apropiadamente las respuestas inmunes humorales, evitando potencialmente respuestas de anticuerpos exacerbadas. Los Tfr pueden reducir tanto el número de Tfh como de LiB de CG. Los Tfr pueden identificarse mediante la expresión de CXCR5, ICOS y PD-1, junto con el factor de transcripción maestro del linaje Treg, Foxp3.

Células Dendríticas Foliculares (FDCs)

Células estromales no hematopoyéticas localizadas en los folículos de LiB. Cumplen funciones esenciales presentando Ags nativos o intactos a LiB en la respuesta de CGs. Son cruciales para la óptima selección de clones de LiB.

Autoinmunidades mediadas por autoanticuerpos

Las autoinmunidades humorales causan una amplia gama de enfermedades autorreactivas que se caracterizan por la producción de autoanticuerpos patógenos. Estos trastornos frecuentemente comparten alelos de riesgo. Por ejemplo, el polimorfismo R620W en PTPN22 se asocia con un mayor riesgo de desarrollar varias enfermedades, que incluyen: artritis reumatoide, diabetes tipo 1, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison y otras.

Lupus eritematoso sistémico (LES)

Enfermedad inflamatoria crónica multisistémica que se caracteriza por títulos altos de autoanticuerpos que efectuaron CSR contra Ags nucleares. Estos autoanticuerpos están invariablemente presentes antes de la aparición de la enfermedad y finalmente conducen a la formación de inmunocomplejos que precipitan en órganos blanco o sistémicamente generando injuria. Los pacientes con LES generalmente tienen una función anormal de las células B y T.

Artritis reumatoidea (AR)

Enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por artritis poliarticular simétrica, por la producción de factor reumatoideo (Igs que son específicas para IgG y que forma inmunocomplejos que se depositan en muchos tejidos) y por la generación de autoanticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos. La aparición del factor reumatoideo y los autoanticuerpos preceden a la enfermedad clínica, implicando respuestas alteradas de los LiB desde inicio del proceso de enfermedad.

Microscopía intravital Two-photon

Microscopía de barrido láser que utiliza luz láser infrarroja pulsada para la excitación de fluoróforos convencionales o proteínas fluorescentes. Permite el estudio de las interacciones celulares en tiempo real dentro de los organismos vivos. Utiliza láseres infrarrojos que facilitan la obtención de imágenes de tejidos profundos al tiempo que limitan la fototoxicidad y el fotoblanqueo.

MicroRNAs

Moléculas de ARN monocatenario de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud que regula la expresión de genes uniéndose a las regiones 3' no traducidas de ARNm específicos. Modulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional.

Bibliografía

1. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012, **30**: 429-457.
2. Whitney CG, Zhou F, Singleton J, Schuchat A, Centers for Disease C, Prevention. Benefits from immunization during the vaccines for children program era - United States, 1994-2013. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2014, **63**(16): 352-355.
3. WHO. Interim guidance for national health authorities and blood transfusion services: use of convalescent whole blood or plasma collected from patients recovered from Ebola virus disease for transfusion, as an empirical treatment during outbreaks. . 2014.
4. Mupapa K, Massamba M, Kibadi K, Kuvula K, Bwaka A, Kipasa M, et al. Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee. *The Journal of infectious diseases* 1999, **179 Suppl 1**: S18-23.
5. Gutfraind A, Meyers LA. Evaluating large-scale blood transfusion therapy for the current Ebola epidemic in Liberia. *The Journal of infectious diseases* 2015, **211**(8): 1262-1267.
6. Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature reviews Microbiology* 2004, **2**(9): 695-703.
7. Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw FM, Lim WS, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *The Journal of infectious diseases* 2015, **211**(1): 80-90.
8. West AP, Jr., Scharf L, Scheid JF, Klein F, Bjorkman PJ, Nussenzweig MC. Structural insights on the role of antibodies in HIV-1 vaccine and therapy. *Cell* 2014, **156**(4): 633-648.
9. Caskey M, Klein F, Lorenzi JC, Seaman MS, West AP, Jr., Buckley N, et al. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* 2015, **522**(7557): 487-491.
10. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol* 2016, **34**: 335-368.
11. Tas JM, Mesin L, Pasqual G, Targ S, Jacobsen JT, Mano YM, et al. Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. *Science* 2016, **351**(6277): 1048-1054.
12. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007, **27**(2): 190-202.
13. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008, **8**(1): 22-33.

14. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994, **12**: 117-139.
15. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996, **381**(6585): 751-758.
16. Tarlinton DM. Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunology and cell biology* 2008, **86**(2): 133-138.
17. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010, **143**(4): 592-605.
18. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991, **354**(6352): 389-392.
19. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991, **67**(6): 1121-1129.
20. Berek C, Milstein C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 1987, **96**: 23-41.
21. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000, **102**(5): 553-563.
22. Weigert MG, Cesari IM, Yonkovich SJ, Cohn M. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 1970, **228**(5276): 1045-1047.
23. Eisen HN, Siskind GW. Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response. *Biochemistry* 1964, **3**: 996-1008.
24. Goidl EA, Paul WE, Siskind GW, Benacerraf B. The effect of antigen dose and time after immunization on the amount and affinity of anti-hapten antibody. *J Immunol* 1968, **100**(2): 371-375.
25. Nussenzweig V, Benacerraf B. Antihapten antibody specificity and L chain type. *J Exp Med* 1967, **126**(4): 727-743.
26. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 2015, **15**(3): 137-148.
27. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* 2011, **12**(1): 24-34.
28. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, *et al.* Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009, **325**(5943): 1006-1010.
29. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, *et al.* The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 2009, **31**(3): 457-468.

30. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 2009, **325**(5943):1001-1005.
31. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008, **29**(1): 138-149.
32. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramsdell RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 2010, **207**(2): 353-363.
33. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 2009, **10**(4): 385-393.
34. Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, et al. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol* 2010, **185**(1): 190-202.
35. King IL, Mohr M. IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med* 2009, **206**(5): 1001-1007.
36. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 2010, **207**(2): 365-378.
37. Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J Exp Med* 2010, **207**(1): 155-171.
38. Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, Weinstein JS, et al. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol* 2010, **185**(1): 313-326.
39. Weinstein JS, Herman EI, Lainez B, Licona-Limon P, Esplugues E, Flavell R, et al. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol* 2016, **17**(10): 1197-1205.
40. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011, **29**: 621-663.
41. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(7): 495-504.
42. Wang X, Cho B, Suzuki K, Xu Y, Green JA, An J, et al. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 2011, **208**(12): 2497-2510.
43. Heesters BA, Chatterjee P, Kim YA, Gonzalez SF, Kuligowski MP, Kirchhausen T, et al. Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 2013, **38**(6): 1164-1175.
44. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* 2013, **38**(3): 596-605.

45. Garin A, Meyer-Hermann M, Contie M, Figge MT, Buatois V, Gunzer M, et al. Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity* 2010, **33**(1): 84-95.
46. Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol* 2010, **11**(11): 989-996.
47. Gonzalez SF, Degn SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annu Rev Immunol* 2011, **29**: 215-233.
48. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998, **281**(5373): 96-99.
49. Okada T, Miller MJ, Parker I, Krummel MF, Neighbors M, Hartley SB, et al. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS biology* 2005, **3**(6): e150.
50. Coffey F, Alabyev B, Manser T. Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity* 2009, **30**(4): 599-609.
51. Gatto D, Paus D, Basten A, Mackay CR, Brink R. Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity* 2009, **31**(2): 259-269.
52. Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, et al. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature* 2011, **475**(7357): 524-527.
53. Kelly LM, Pereira JP, Yi T, Xu Y, Cyster JG. EBI2 guides serial movements of activated B cells and ligand activity is detectable in lymphoid and nonlymphoid tissues. *J Immunol* 2011, **187**(6): 3026-3032.
54. Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* 2009, **460**(7259): 1122-1126.
55. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2012, **30**: 69-94.
56. Green JA, Cyster JG. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol Rev* 2012, **247**(1): 36-51.
57. Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhar G, Livshits G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH, et al. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 2007, **446**(7131): 83-87.
58. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007, **315**(5811): 528-531.
59. Hauser AE, Junt T, Mempel TR, Sneddon MW, Kleinstein SH, Henrickson SE, et al. Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 2007, **26**(5): 655-667.

60. Yoshino T, Kondo E, Cao L, Takahashi K, Hayashi K, Nomura S, et al. Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* 1994, **83**(7): 1856-1861.
61. Cervenak L, Magyar A, Boja R, Laszlo G. Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunology letters* 2001, **78**(2): 89-96.
62. Naito Y, Takematsu H, Koyama S, Miyake S, Yamamoto H, Fujinawa R, et al. Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Molecular and cellular biology* 2007, **27**(8): 3008-3022.
63. Rose ML, Birbeck MS, Wallis VJ, Forrester JA, Davies AJ. Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* 1980, **284**(5754): 364-366.
64. Bhan AK, Nadler LM, Stashenko P, McCluskey RT, Schlossman SF. Stages of B cell differentiation in human lymphoid tissue. *J Exp Med* 1981, **154**(3): 737-749.
65. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. Mouse CD38 is down-regulated on germinal center B cells and mature plasma cells. *J Immunol* 1997, **158**(3): 1108-1115.
66. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Advances in immunology* 2010, **105**: 193-210.
67. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 1995, **86**(1): 45-53.
68. Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, et al. BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 1995, **86**(1): 28-37.
69. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nature genetics* 1997, **16**(2): 161-170.
70. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997, **276**(5312): 589-592.
71. Ci W, Polo JM, Cerchietti L, Shaknovich R, Wang L, Yang SN, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 2009, **113**(22): 5536-5548.
72. Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C, et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(27): 11294-11299.
73. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004, **432**(7017): 635-639.
74. Ranuncolo SM, Polo JM, Dierov J, Singer M, Kuo T, Grealley J, et al. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 2007, **8**(7): 705-714.

75. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000, **13**(2): 199-212.
76. Basso K, Saito M, Sumazin P, Margolin AA, Wang K, Lim WK, et al. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 2010, **115**(5): 975-984.
77. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004, **5**(9): 943-952.
78. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 2012, **120**(11): 2240-2248.
79. Bannard O, Horton RM, Allen CD, An J, Nagasawa T, Cyster JG. Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 2013, **39**(5): 912-924.
80. Rodda LB, Bannard O, Ludewig B, Nagasawa T, Cyster JG. Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. *J Immunol* 2015, **195**(10): 4781-4791.
81. McHeyzer-Williams LJ, Milpied PJ, Okitsu SL, McHeyzer-Williams MG. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat Immunol* 2015, **16**(3): 296-305.
82. Meyer-Hermann ME, Maini PK, Iber D. An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centers. *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA* 2006, **23**(3): 255-277.
83. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 2011, **17**(8): 983-988.
84. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011, **17**(8): 975-982.
85. Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernandez A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells. *J Immunol* 2011, **187**(9): 4553-4560.
86. Ramiscal RR, Vinuesa CG. T-cell subsets in the germinal center. *Immunol Rev* 2013, **252**(1): 146-155.
87. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol* 2015, **36**(7): 410-418.
88. Dominguez-Sola D, Victora GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC, et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* 2012, **13**(11): 1083-1091.
89. Baumann I, Kolowos W, Voll RE, Manger B, Gaipl U, Neuhuber WL, et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002, **46**(1): 191-201.

90. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, *et al.* Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 2004, **304**(5674): 1147-1150.
91. Rahman ZS, Shao WH, Khan TN, Zhen Y, Cohen PL. Impaired apoptotic cell clearance in the germinal center by Mer-deficient tingible body macrophages leads to enhanced antibody-forming cell and germinal center responses. *J Immunol* 2010, **185**(10): 5859-5868.
92. Beltman JB, Allen CD, Cyster JG, de Boer RJ. B cells within germinal centers migrate preferentially from dark to light zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(21): 8755-8760.
93. Fooksman DR, Schwickert TA, Victora GD, Dustin ML, Nussenzweig MC, Skokos D. Development and migration of plasma cells in the mouse lymph node. *Immunity* 2010, **33**(1): 118-127.
94. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(9): 618-629.
95. Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, *et al.* Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 2006, **25**(6): 989-1001.
96. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 2016, **45**(3): 471-482.
97. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014, **41**(4): 529-542.
98. Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 2016, **16**(10): 612-625.
99. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, *et al.* Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000, **192**(11): 1545-1552.
100. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 2000, **192**(11): 1553-1562.
101. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 2001, **193**(12): 1373-1381.
102. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 1999, **190**(8): 1123-1134.
103. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Eklund EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998, **391**(6669): 799-803.
104. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**(12): 933-944.
105. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007, **25**: 821-852.

106. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008, **112**(5): 1557-1569.
107. Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J Immunol* 2013, **190**(7): 3049-3053.
108. Karnowski A, Chevrier S, Belz GT, Mount A, Emslie D, D'Costa K, et al. B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *J Exp Med* 2012, **209**(11): 2049-2064.
109. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS one* 2011, **6**(3): e17739.
110. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 2008, **29**(1): 127-137.
111. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, et al. The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 2014, **15**(9): 856-865.
112. Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunology and cell biology* 2009, **87**(8): 590-600.
113. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity* 2009, **31**(1): 158-169.
114. Ballesteros-Tato A, Leon B, Graf BA, Moquin A, Adams PS, Lund FE, et al. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. *Immunity* 2012, **36**(5): 847-856.
115. Leon B, Bradley JE, Lund FE, Randall TD, Ballesteros-Tato A. FoxP3+ regulatory T cells promote influenza-specific Tfh responses by controlling IL-2 availability. *Nat Commun* 2014, **5**: 3495.
116. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989, **342**(6252): 929-931.
117. Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Briere F, et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995, **268**(5211): 720-722.
118. Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol* 1995, **155**(2): 556-567.
119. Toellner KM, Luther SA, Sze DM, Choy RK, Taylor DR, MacLennan IC, et al. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med* 1998, **187**(8): 1193-1204.

120. Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 2008, **455**(7214): 764-769.
121. Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med* 2011, **208**(6): 1243-1252.
122. Shih TA, Meffre E, Roederer M, Nussenzweig MC. Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat Immunol* 2002, **3**(6): 570-575.
123. Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* 2006, **203**(4): 1081-1091.
124. O'Connor BP, Vogel LA, Zhang W, Loo W, Shnider D, Lind EF, et al. Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor. *J Immunol* 2006, **177**(11): 7723-7732.
125. Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, Johnson KL, Gonzalez DG, Kleinstein SH, et al. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 2011, **34**(6): 947-960.
126. Taylor JJ, Pape KA, Jenkins MK. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med* 2012, **209**(3): 597-606.
127. Baumjohann D, Okada T, Ansel KM. Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. *J Immunol* 2011, **187**(5): 2089-2092.
128. Meyer-Hermann M, Mohr E, Pelletier N, Zhang Y, Victora GD, Toellner KM. A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. *Cell reports* 2012, **2**(1): 162-174.
129. Shulman Z, Gitlin AD, Targ S, Jankovic M, Pasqual G, Nussenzweig MC, et al. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* 2013, **341**(6146): 673-677.
130. Phan TG, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, et al. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med* 2006, **203**(11): 2419-2424.
131. Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *The EMBO journal* 1997, **16**(11): 2996-3006.
132. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol* 2016, **17**(7): 861-869.
133. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 2015, **15**(3): 149-159.
134. Tarlinton D, Good-Jacobson K. Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility. *Science* 2013, **341**(6151): 1205-1211.

135. Kometani K, Nakagawa R, Shinnakasu R, Kaji T, Rybouchkin A, Moriyama S, *et al.* Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* 2013, **39**(1): 136-147.
136. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015, **15**(3): 160-171.
137. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994, **77**(2): 297-306.
138. Minnich M, Tagoh H, Bonelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, *et al.* Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol* 2016, **17**(3): 331-343.
139. Tellier J, Shi W, Minnich M, Liao Y, Crawford S, Smyth GK, *et al.* Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat Immunol* 2016, **17**(3): 323-330.
140. Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuiji M, Inoue T, *et al.* Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J Exp Med* 2015, **212**(10): 1709-1723.
141. Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 1996, **183**(5): 2259-2269.
142. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T, Nakaya HI, *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011, **470**(7335): 543-547.
143. Sutherland DB, Suzuki K, Fagarasan S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol Rev* 2016, **270**(1): 20-31.
144. Klein F, Diskin R, Scheid JF, Gaebler C, Mouquet H, Georgiev IS, *et al.* Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell* 2013, **153**(1): 126-138.
145. Pappas L, Foglierini M, Piccoli L, Kallewaard NL, Turrini F, Silacci C, *et al.* Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations. *Nature* 2014, **516**(7531): 418-422.
146. Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, *et al.* A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 2005, **435**(7041): 452-458.
147. Robbiani DF, Deroubaix S, Feldhahn N, Oliveira TY, Callen E, Wang Q, *et al.* Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* 2015, **162**(4): 727-737.
148. Dogan I, Bertocci B, Vilmon V, Delbos F, Megret J, Storck S, *et al.* Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009, **10**(12): 1292-1299.
149. Cirelli KM, Crotty S. Germinal center enhancement by extended antigen availability. *Current opinion in immunology* 2017, **47**: 64-69.

150. Havenar-Daughton C, Lee JH, Crotty S. Tfh cells and HIV bnAbs, an immunodominance model of the HIV neutralizing antibody generation problem. *Immunol Rev* 2017, **275**(1): 49-61.
151. Victora GD, Wilson PC. Germinal center selection and the antibody response to influenza. *Cell* 2015, **163**(3): 545-548.
152. Brink R, Phan TG. Self-Reactive B Cells in the Germinal Center Reaction. *Annu Rev Immunol* 2018.
153. Goodnow CC. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu Rev Immunol* 1992, **10**: 489-518.
154. Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG. The regulation of self-reactive B cells. *Current opinion in immunology* 1995, **7**(6): 804-811.
155. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 2017, **17**(5): 281-294.
156. Brink R. The imperfect control of self-reactive germinal center B cells. *Current opinion in immunology* 2014, **28**: 97-101.
157. Wellmann U, Letz M, Herrmann M, Angermuller S, Kalden JR, Winkler TH. The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(26): 9258-9263.
158. Becker-Herman S, Meyer-Bahlburg A, Schwartz MA, Jackson SW, Hudkins KL, Liu C, et al. WASp-deficient B cells play a critical, cell-intrinsic role in triggering autoimmunity. *J Exp Med* 2011, **208**(10): 2033-2042.
159. Teichmann LL, Schenten D, Medzhitov R, Kashgarian M, Shlomchik MJ. Signals via the adaptor MyD88 in B cells and DCs make distinct and synergistic contributions to immune activation and tissue damage in lupus. *Immunity* 2013, **38**(3): 528-540.
160. Jackson SW, Scharping NE, Kolhatkar NS, Khim S, Schwartz MA, Li QZ, et al. Opposing impact of B cell-intrinsic TLR7 and TLR9 signals on autoantibody repertoire and systemic inflammation. *J Immunol* 2014, **192**(10): 4525-4532.
161. Hua Z, Gross AJ, Lamagna C, Ramos-Hernandez N, Scapini P, Ji M, et al. Requirement for MyD88 signaling in B cells and dendritic cells for germinal center anti-nuclear antibody production in Lyn-deficient mice. *J Immunol* 2014, **192**(3): 875-885.
162. Domeier PP, Chodiseti SB, Soni C, Schell SL, Elias MJ, Wong EB, et al. IFN-gamma receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J Exp Med* 2016, **213**(5): 715-732.
163. Jackson SW, Jacobs HM, Arkatkar T, Dam EM, Scharping NE, Kolhatkar NS, et al. B cell IFN-gamma receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. *J Exp Med* 2016, **213**(5): 733-750.
164. Crestani E, Volpi S, Candotti F, Giliani S, Notarangelo LD, Chu J, et al. Broad spectrum of autoantibodies in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015, **136**(5): 1401-1404 e1401-1403.

165. Recher M, Burns SO, de la Fuente MA, Volpi S, Dahlberg C, Walter JE, et al. B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood* 2012, **119**(12): 2819-2828.
166. Luzina IG, Atamas SP, Storrer CE, daSilva LC, Kelsoe G, Papadimitriou JC, et al. Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. *J Leukoc Biol* 2001, **70**(4): 578-584.
167. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008, **9**(2): 166-175.
168. Lee SK, Silva DG, Martin JL, Pratama A, Hu X, Chang PP, et al. Interferon-gamma excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers. *Immunity* 2012, **37**(5): 880-892.
169. Soni C, Wong EB, Domeier PP, Khan TN, Satoh T, Akira S, et al. B cell-intrinsic TLR7 signaling is essential for the development of spontaneous germinal centers. *J Immunol* 2014, **193**(9): 4400-4414.
170. Wong EB, Khan TN, Mohan C, Rahman ZS. The lupus-prone NZM2410/NZW strain-derived Sle1b sublocus alters the germinal center checkpoint in female mice in a B cell-intrinsic manner. *J Immunol* 2012, **189**(12): 5667-5681.
171. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(12): 845-857.
172. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**(3): 205-217.
173. Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS medicine* 2009, **6**(1): e1.
174. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(7): 447-462.
175. Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, Jackson SW. Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2017, **17**(7): 421-436.
176. Pala F, Morbach H, Castiello MC, Schickel JN, Scaramuzza S, Chamberlain N, et al. Lentiviral-mediated gene therapy restores B cell tolerance in Wiskott-Aldrich syndrome patients. *The Journal of clinical investigation* 2015, **125**(10): 3941-3951.
177. Kolhatkar NS, Brahmandam A, Thouvenel CD, Becker-Herman S, Jacobs HM, Schwartz MA, et al. Altered BCR and TLR signals promote enhanced positive selection of autoreactive transitional B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 2015, **212**(10): 1663-1677.
178. Lamagna C, Hu Y, DeFranco AL, Lowell CA. B cell-specific loss of Lyn kinase leads to autoimmunity. *J Immunol* 2014, **192**(3): 919-928.

179. Xu Y, Harder KW, Huntington ND, Hibbs ML, Tarlinton DM. Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 2005, **22**(1): 9-18.
180. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *American journal of human genetics* 2004, **75**(3): 504-507.
181. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics* 2004, **36**(4): 337-338.
182. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics* 2004, **75**(2): 330-337.
183. Rawlings DJ, Dai X, Buckner JH. The role of PTPN22 risk variant in the development of autoimmunity: finding common ground between mouse and human. *J Immunol* 2015, **194**(7): 2977-2984.
184. Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL, Aderem A, Ravetch JV. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* 2006, **203**(3): 553-561.
185. Walsh ER, Pisitkun P, Voynova E, Deane JA, Scott BL, Caspi RR, et al. Dual signaling by innate and adaptive immune receptors is required for TLR7-induced B-cell-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(40): 16276-16281.
186. Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, Kaufman KM, et al. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(36): 15838-15843.
187. Garcia-Ortiz H, Velazquez-Cruz R, Espinosa-Rosales F, Jimenez-Morales S, Baca V, Orozco L. Association of TLR7 copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Annals of the rheumatic diseases* 2010, **69**(10): 1861-1865.
188. Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O, Spolski R, Shaffer DJ, Morse HC, 3rd, et al. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(5): 1518-1523.
189. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 2004, **173**(9): 5361-5371.
190. Rankin AL, Guay H, Herber D, Bertino SA, Duzanski TA, Carrier Y, et al. IL-21 receptor is required for the systemic accumulation of activated B and T lymphocytes in MRL/MpJ-Fas(lpr/lpr)/J mice. *J Immunol* 2012, **188**(4): 1656-1667.
191. Bubier JA, Bennett SM, Sproule TJ, Lyons BL, Olland S, Young DA, et al. Treatment of BXSB-Yaa mice with IL-21R-Fc fusion protein minimally attenuates systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007, **1110**: 590-601.
192. McPhee CG, Bubier JA, Sproule TJ, Park G, Steinbuck MP, Schott WH, et al. IL-21 is a double-edged sword in the systemic lupus erythematosus-like disease of BXSB.Yaa mice. *J Immunol* 2013, **191**(9): 4581-4588.

193. Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med* 1998, **188**(10): 1895-1906.
194. Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, Daruwalla J, Tackey E, Takada K, et al. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* 2010, **62**(2): 542-552.
195. de Valle E, Grigoriadis G, O'Reilly LA, Willis SN, Maxwell MJ, Corcoran LM, et al. NFkappaB1 is essential to prevent the development of multiorgan autoimmunity by limiting IL-6 production in follicular B cells. *J Exp Med* 2016, **213**(4): 621-641.
196. Vanden Bush TJ, Bishop GA. TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation. *Eur J Immunol* 2008, **38**(2): 400-409.
197. Goenka R, Matthews AH, Zhang B, O'Neill PJ, Scholz JL, Migone TS, et al. Local BLYS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med* 2014, **211**(1): 45-56.
198. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(5): 2610-2615.
199. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MG, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 2005, **52**(5): 1491-1503.
200. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003, **197**(6): 711-723.
201. Haas C, Ryffel B, Le Hir M. IFN-gamma is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol* 1997, **158**(11): 5484-5491.
202. Schwarting A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelley VR. IFN-gamma receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Immunol* 1998, **161**(1): 494-503.
203. Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol* 2016, **34**: 243-264.
204. Bonzi J, Bornet O, Betzi S, Kasper BT, Mahal LK, Mancini SJ, et al. Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. *Nat Commun* 2015, **6**: 6194.
205. Liu SD, Whiting CC, Tomassian T, Pang M, Bissel SJ, Baum LG, et al. Endogenous galectin-1 enforces class I-restricted TCR functional fate decisions in thymocytes. *Blood* 2008, **112**(1): 120-130.
206. Thiemann S, Baum LG. The road less traveled: regulation of leukocyte migration across vascular and lymphatic endothelium by galectins. *Journal of clinical immunology* 2011, **31**(1): 2-9.

207. Cooper D, Iqbal AJ, Gittens BR, Cervone C, Perretti M. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012, **1253**: 181-192.
208. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* 2009, **185**(3): 381-385.
209. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010, **1183**: 158-182.
210. Baum LG, Garner OB, Schaefer K, Lee B. Microbe-Host Interactions are Positively and Negatively Regulated by Galectin-Glycan Interactions. *Frontiers in immunology* 2014, **5**: 284.
211. Lichtenstein RC, Rabinovich GA. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell death and differentiation* 2013, **20**(8): 976-986.
212. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(5): 338-352.
213. Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *J Immunol* 2017, **199**(11): 3721-3730.
214. Mendez-Huergo SP, Blidner AG, Rabinovich GA. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Current opinion in immunology* 2017, **45**: 8-15.
215. Rabinovich GA, Croci DO. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2012, **36**(3): 322-335.
216. Toscano MA, Martinez Allo VC, Cutine AM, Rabinovich GA, Marino KV. Untangling Galectin-Driven Regulatory Circuits in Autoimmune Inflammation. *Trends in molecular medicine* 2018, **24**(4): 348-363.
217. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Mendez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell* 2014, **156**(4): 744-758.
218. Dumic J, Dabelic S, Fogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006, **1760**(4): 616-635.
219. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(34): 14496-14501.
220. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2004, **172**(1): 493-502.
221. Vasta GR, Ahmed H, Nita-Lazar M, Banerjee A, Pasek M, Shridhar S, et al. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Frontiers in immunology* 2012, **3**: 199.

222. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nature reviews Microbiology* 2009, **7**(6): 424-438.
223. Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2008, **180**(4): 2466-2473.
224. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001, **409**(6821): 733-739.
225. Fermino ML, Dias FC, Lopes CD, Souza MA, Cruz AK, Liu FT, et al. Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* 2013, **43**(7): 1806-1817.
226. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, et al. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 2008, **180**(5): 3091-3102.
227. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(13): 6737-6742.
228. Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* 1998, **161**(1): 385-389.
229. Oliveira FL, Brand C, Paula AA, Arcanjo KD, Hsu DK, Liu FT, et al. Lack of galectin-3 disturbs mesenteric lymph node homeostasis and B cell niches in the course of *Schistosoma mansoni* infection. *PloS one* 2011, **6**(5): e19216.
230. Oliveira FL, Frazao P, Chammas R, Hsu DK, Liu FT, Borojevic R, et al. Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine schistosomiasis in galectin-3 -/- mice. *J Leukoc Biol* 2007, **82**(2): 300-310.
231. Oliveira FL, Chammas R, Ricon L, Fermino ML, Bernardes ES, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates peritoneal B1-cell differentiation into plasma cells. *Glycobiology* 2009, **19**(11): 1248-1258.
232. Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, et al. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2004, **164**(3): 893-902.
233. Clark AG, Weston ML, Foster MH. Lack of galectin-1 or galectin-3 alters B cell deletion and anergy in an autoantibody transgene model. *Glycobiology* 2013, **23**(7): 893-903.
234. Lafrenz D, Koretz S, Stratte PT, Ward RB, Strober S. LPS-induced differentiation of a murine B cell leukemia (BCL1): changes in surface and secreted IgM. *J Immunol* 1982, **129**(3): 1329-1335.
235. Schliephake DE, Schimpl A. Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti-mu F(ab')₂-co-stimulated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996, **26**(1): 268-271.
236. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 2004, **21**(1): 81-93.

237. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 2006, **7**(7): 773-782.
238. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 2003, **19**(4): 607-620.
239. Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta* 2010, **1800**(2): 181-189.
240. Good-Jacobson KL, Groom JR. Tailoring Immune Responses toward Autoimmunity: Transcriptional Regulators That Drive the Creation and Collusion of Autoreactive Lymphocytes. *Frontiers in immunology* 2018, **9**: 482.
241. Xu B, Wang S, Zhou M, Huang Y, Fu R, Guo C, et al. The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology* 2017, **183**: 46-53.
242. Fan W, Demers AJ, Wan Y, Li Q. Altered Ratio of T Follicular Helper Cells to T Follicular Regulatory Cells Correlates with Autoreactive Antibody Response in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. *J Immunol* 2018, **200**(9): 3180-3187.
243. Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, et al. CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J Immunol* 1998, **160**(5): 2145-2157.
244. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev* 2016, **270**(1): 8-19.
245. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 2008, **26**: 261-292.
246. Xu W, Zhang JJ. Stat1-dependent synergistic activation of T-bet for IgG2a production during early stage of B cell activation. *J Immunol* 2005, **175**(11): 7419-7424.
247. Peng SL, Szabo SJ, Glimcher LH. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(8): 5545-5550.
248. Kim YU, Lim H, Jung HE, Wetsel RA, Chung Y. Regulation of autoimmune germinal center reactions in lupus-prone BXD2 mice by follicular helper T cells. *PLoS one* 2015, **10**(3): e0120294.
249. Jang E, Cho SH, Park H, Paik DJ, Kim JM, Youn J. A positive feedback loop of IL-21 signaling provoked by homeostatic CD4+CD25- T cell expansion is essential for the development of arthritis in autoimmune K/BxN mice. *J Immunol* 2009, **182**(8): 4649-4656.
250. Domeier PP, Schell SL, Rahman ZS. Spontaneous germinal centers and autoimmunity. *Autoimmunity* 2017, **50**(1): 4-18.

251. Arkatkar T, Du SW, Jacobs HM, Dam EM, Hou B, Buckner JH, et al. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2017, **214**(11): 3207-3217.
252. Nusser A, Nuber N, Wirz OF, Rolink H, Andersson J, Rolink A. The development of autoimmune features in aging mice is closely associated with alterations of the peripheral CD4(+) T-cell compartment. *Eur J Immunol* 2014, **44**(10): 2893-2902.
253. Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus* 2011, **20**(3): 250-255.
254. Zhang J, Jacobi AM, Wang T, Diamond B. Pathogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus are derived from both self-reactive and non-self-reactive B cells. *Molecular medicine* 2008, **14**(11-12): 675-681.
255. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune diseases* 2014, **2014**: 321359.
256. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011, **365**(22): 2110-2121.
257. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nature reviews Disease primers* 2016, **2**: 16039.
258. Jacob CO, van der Meide PH, McDevitt HO. In vivo treatment of (NZB X NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J Exp Med* 1987, **166**(3): 798-803.
259. Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *The Journal of clinical investigation* 1998, **101**(2): 364-371.
260. Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol* 2008, **181**(3): 2211-2219.
261. Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. *Lupus* 2014, **23**(6): 518-526.
262. Ruff WE, Kriegel MA. Autoimmune host-microbiota interactions at barrier sites and beyond. *Trends in molecular medicine* 2015, **21**(4): 233-244.
263. Shamriz O, Mizrahi H, Werbner M, Shoenfeld Y, Avni O, Koren O. Microbiota at the crossroads of autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 2016, **15**(9): 859-869.
264. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016, **535**(7610): 75-84.
265. Van Praet JT, Donovan E, Vanassche I, Drennan MB, Windels F, Dendooven A, et al. Commensal microbiota influence systemic autoimmune responses. *The EMBO journal* 2015, **34**(4): 466-474.

266. Longman RS, Yang Y, Diehl GE, Kim SV, Littman DR. Microbiota: host interactions in mucosal homeostasis and systemic autoimmunity. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2013, **78**: 193-201.
267. Longman RS, Littman DR. The functional impact of the intestinal microbiome on mucosal immunity and systemic autoimmunity. *Current opinion in rheumatology* 2015, **27**(4): 381-387.
268. Rosser EC, Mauri C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 2016, **74**: 85-93.
269. Teng F, Klinger CN, Felix KM, Bradley CP, Wu E, Tran NL, et al. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity* 2016, **44**(4): 875-888.
270. Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T, et al. Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity* 2016, **44**(3): 659-671.
271. Haghikia A, Jorg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, et al. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity* 2015, **43**(4): 817-829.
272. Jones L, Ho WQ, Ying S, Ramakrishna L, Srinivasan KG, Yurieva M, et al. A subpopulation of high IL-21-producing CD4(+) T cells in Peyer's Patches is induced by the microbiota and regulates germinal centers. *Scientific reports* 2016, **6**: 30784.
273. Yoshiya K, Lapchak PH, Thai TH, Kannan L, Rani P, Dalle Lucca JJ, et al. Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011, **301**(6): G1020-1030.
274. Forsman H, Islander U, Andreasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlstrom A, et al. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2011, **63**(2): 445-454.
275. Gittens BR, Bodkin JV, Nourshargh S, Perretti M, Cooper D. Galectin-3: A Positive Regulator of Leukocyte Recruitment in the Inflamed Microcirculation. *J Immunol* 2017, **198**(11): 4458-4469.
276. Li P, Liu S, Lu M, Bandyopadhyay G, Oh D, Imamura T, et al. Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance. *Cell* 2016, **167**(4): 973-984 e912.
277. Boehm T, Hess I, Swann JB. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol* 2012, **33**(6): 315-321.
278. Neely HR, Flajnik MF. Emergence and Evolution of Secondary Lymphoid Organs. *Annual review of cell and developmental biology* 2016, **32**: 693-711.
279. Flajnik MF. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2018, **18**(7): 438-453.
280. Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nature reviews Rheumatology* 2012, **8**(6): 337-347.

281. Brand C, Oliveira FL, Takiya CM, Palumbo A, Jr., Hsu DK, Liu FT, et al. The involvement of the spleen during chronic phase of *Schistosoma mansoni* infection in galectin-3-/- mice. *Histol Histopathol* 2012, **27**(8): 1109-1120.
282. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, Chicheportiche Y, Watanabe N, Saito T, et al. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcγ receptor III. *J Exp Med* 2000, **191**(8): 1293-1302.
283. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989, **7**: 145-173.
284. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008, **133**(5): 775-787.
285. Ding Y, Li J, Yang P, Luo B, Wu Q, Zajac AJ, et al. Interleukin-21 promotes germinal center reaction by skewing the follicular regulatory T cell to follicular helper T cell balance in autoimmune BXD2 mice. *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(9): 2601-2612.
286. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007, **27**(6): 847-859.
287. de Yebenes VG, Bartolome-Izquierdo N, Nogales-Cadenas R, Perez-Duran P, Mur SM, Martinez N, et al. miR-217 is an oncogene that enhances the germinal center reaction. *Blood* 2014, **124**(2): 229-239.
288. Wang L, Inohara H, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **217**(1): 292-303.
289. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995, **147**(3): 815-822.
290. Fritsch K, Mernberger M, Nist A, Stiewe T, Brehm A, Jacob R. Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex. *BMC Cancer* 2016, **16**: 502.
291. Good-Jacobson KL, Song E, Anderson S, Sharpe AH, Shlomchik MJ. CD80 expression on B cells regulates murine T follicular helper development, germinal center B cell survival, and plasma cell generation. *J Immunol* 2012, **188**(9): 4217-4225.
292. Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Takeno M, Sakane T, Suzuki N. Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2003, **21**(1): 71-77.
293. Morokata T, Kato T, Igarashi O, Nariuchi H. Mechanism of enhanced antigen presentation by B cells activated with anti-μ plus interferon-γ: role of B7-2 in the activation of naive and memory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1995, **25**(7): 1992-1998.
294. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* 2013, **39**(4): 770-781.

295. Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, et al. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2009, **206**(3): 561-576.
296. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010, **62**(1): 234-244.
297. Weinstein JS, Hernandez SG, Craft J. T cells that promote B-Cell maturation in systemic autoimmunity. *Immunol Rev* 2012, **247**(1): 160-171.
298. Seery JP. IFN-gamma transgenic mice: clues to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus? *Arthritis Res* 2000, **2**(6): 437-440.
299. Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, Izui S. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer Semin Immunopathol* 2006, **28**(2): 175-184.
300. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, et al. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 2011, **28**(5): 451-462.
301. Mobergslien A, Sioud M. Galectin-1 and -3 gene silencing in immature and mature dendritic cells enhances T cell activation and interferon-gamma production. *J Leukoc Biol* 2012, **91**(3): 461-467.
302. Tseng PC, Chen CL, Shan YS, Lin CF. An increase in galectin-3 causes cellular unresponsiveness to IFN-gamma-induced signal transduction and growth inhibition in gastric cancer cells. *Oncotarget* 2016, **7**(12): 15150-15160.
303. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995, **80**(5): 695-705.
304. Hardin G. The competitive exclusion principle. *Science* 1960, **131**(3409): 1292-1297.
305. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 1991, **173**(5): 1165-1175.
306. Jacob J, Przylepa J, Miller C, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med* 1993, **178**(4): 1293-1307.
307. Laver WG, Air GM, Webster RG, Smith-Gill SJ. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* 1990, **61**(4): 553-556.
308. Kuraoka M, Schmidt AG, Nojima T, Feng F, Watanabe A, Kitamura D, et al. Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers. *Immunity* 2016, **44**(3): 542-552.

309. Finney J, Yeh CH, Kelsoe G, Kuraoka M. Germinal center responses to complex antigens. *Immunol Rev* 2018, **284**(1): 42-50.
310. Bannard O, Cyster JG. Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. *Current opinion in immunology* 2017, **45**: 21-30.
311. Liao HX, Lynch R, Zhou T, Gao F, Alam SM, Boyd SD, et al. Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* 2013, **496**(7446): 469-476.
312. Lingwood D, McTamney PM, Yassine HM, Whittle JR, Guo X, Boyington JC, et al. Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies. *Nature* 2012, **489**(7417): 566-570.
313. Tan J, Pieper K, Piccoli L, Abdi A, Perez MF, Geiger R, et al. A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens. *Nature* 2016, **529**(7584): 105-109.
314. Raj T, Kuchroo M, Replogle JM, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL. Common risk alleles for inflammatory diseases are targets of recent positive selection. *American journal of human genetics* 2013, **92**(4): 517-529.
315. Ramos PS, Shedlock AM, Langefeld CD. Genetics of autoimmune diseases: insights from population genetics. *Journal of human genetics* 2015, **60**(11): 657-664.
316. Gomez LM, Anaya JM, Martin J. Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. *Human immunology* 2005, **66**(12): 1242-1247.
317. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS letters* 2011, **585**(23): 3689-3698.
318. Clatworthy MR, Willcocks L, Urban B, Langhorne J, Williams TN, Peshu N, et al. Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcγRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(17): 7169-7174.
319. Tribulatti MV, Mucci J, Cattaneo V, Aguero F, Gilmartin T, Head SR, et al. Galectin-8 induces apoptosis in the CD4(high)CD8(high) thymocyte subpopulation. *Glycobiology* 2007, **17**(12): 1404-1412.
320. Tribulatti MV, Figini MG, Carabelli J, Cattaneo V, Campetella O. Redundant and antagonistic functions of galectin-1, -3, and -8 in the elicitation of T cell responses. *J Immunol* 2012, **188**(7): 2991-2999.
321. Beccaria CG, Amezcuca Vesely MC, Fiocca Vernengo F, Gehrau RC, Ramello MC, Tosello Boari J, et al. Galectin-3 deficiency drives lupus-like disease by promoting spontaneous germinal centers formation via IFN-gamma. *Nat Commun* 2018, **9**(1): 1628.

Producción Científica

PUBLICACIONES

Galectin-3 deficiency drives lupus-like disease by promoting spontaneous germinal centers formation via IFN- γ . **Beccaria CG**, Amezcua-Vesely MC, Fiocca-Vernengo F, Gehrau RC, Ramello MC, Tosello-Boari J, Gorosito-Serrán M, Mucci J, Piaggio E, Campetella O, Montes CL, Acosta-Rodriguez EV, Gruppi A. *Nat Commun.* 2018 Apr 24;9(1):1628. doi: 10.1038/s41467-018-04063-5.

Unconventional pro-inflammatory CD4+ T cell response in B cell deficient mice infected with Trypanosoma cruzi. Gorosito Serrán M, Tosello Boari J, Fiocca Vernengo F, **Beccaria CG**, Ramello MC, Bermejo DA, Cook AG, Vinuesa CG, Montes CL, Acosta Rodriguez EV, Gruppi A. *Front Immunol.* 2017 Nov 21;8:1548. doi: 10.3389/fimmu.2017.01548. eCollection 2017

Tissue tropism of Saint Louis encephalitis virus: histopathology triggered by epidemic and non-epidemic strains isolated in Argentina. Rivarola ME, Albrieu-Llinás G, Pisano MB, Tauro LB, Gorosito-Serrán M, **Beccaria CG**; Díaz AL, Vázquez A, Quaglia A, López C, Spinsanti L, Gruppi A, Contigiani MS. *Virology.* Volume 505, May 2017, Pages 181–192. doi: 10.1016/j.virol.2017.02.023

The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL-10 production. Gorosito Serrán M, Fiocca Vernengo F, **Beccaria CG**, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. *FEBS Lett.* 2015 Nov 14;589(22):3362-9. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.048. Epub 2015 Sep 28.

CAPÍTULOS DE LIBROS

“Inmunidad mediada por linfocitos B. Cooperación celular en la respuesta de anticuerpos”.

Beccaria CG, Fiocca Vernengo F, Gorosito Serrán M, Montes CL, Acosta Rodriguez EV, Gruppi A. Microbiología Biomédica. Atlante Editorial. Third Edition. In press.

PREMIOS Y DISTINCIONES

Premio “Leonardo Satz” al mejor trabajo en inmunología presentado en la LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (Mar del Plata, 2014), titulado: *Galectin-3 regulates germinal centers formation, autoreactive and long-lived antibody response*. **Cristian Gabriel Beccaria**, María Carolina Amezcua Vesely, Facundo Fiocca Vernengo, Melisa Gorosito Serrán, María Cecilia Ramello, Jimena Tosello Boari, Juan Mucci, Oscar Competella, Carolina Lucía Montes, Eva Virginia Acosta Rodríguez, Adriana Gruppi.

Premio al Mejor Póster, Área Inmunología, presentado en el X Congreso de Protozoología y enfermedades parasitarias organizado por la Sociedad Argentina de Protozoología (Mar Del Plata, 2014), titulado: “*B cells regulate the inflammatory CD4+ T cell response in Trypanosoma cruzi infection*”. Melisa Gorosito Serrán; Jimena Tosello Boari; Daniela A Bermejo; María C Ramello; **Cristian Beccaria**; Facundo Fiocca Vernengo; María C Amezcua Vesely; Carolina L Montes; Eva V Acosta Rodriguez; Adriana Gruppi.

BECAS

Travel Fellowship to attend the 8th SigN-IFReC NIF Winter School on Advanced Immunology from 20-23 January 2019 held in Grand Copthorne Waterfront Hotel, Singapore. Assigned by the NIF2019 Organizing Committee.

Boeringher Ingelheim Stiftung Travel Award for 19th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centres in Immune Reactions (GCC). Assigned by the Scientific Committee of the 19th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centres in Immune Reactions (GCC). September 14-17, 2017, San Servolo Island, Venice - Italy. Organizers: Stefano Casola (IFOM, IT) and Sidonia Fagarasan (IMS Riken, JP).

Travel Awards IUIS/AAI for the AAI Advanced Course in Immunology. Co-sponsored by AAI and the International Union of Immunological Societies (IUIS). Course Director: Ulrich H. von Andrian, M.D., Ph.D. Harvard Medical School and Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard. July 23-28, 2017. Seaport World Trade Center, Boston, MA.

Keystone Symposia scholarship - T Follicular Helper Cells and Germinal Centers (B4). Scholarship: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Grant #1R13AI122341-01. Scientific Organizers: Shane Crotty and Carola G. Vinuesa. Feb 26 - Mar 1, 2016, in Hyatt Regency Monterey in Monterey, California. Oral Presenter in Workshop 2 session (February 28, 2016) & Poster Presenter in Poster Session 1 (February 27, 2016).

Beca Interna Doctoral. Convocatoria 2012 (Abril 2013 - Marzo 2018). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Argentina. Directora: Adriana Gruppi. Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Universidad Nacional de Córdoba.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

Los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo de tesis fueron presentados en las siguientes Reuniones Científicas:

Noviembre de 2017. *Dissecting the role of Galectin-3, IFN- γ and microbiota in Germinal Center B cell fate decisions*. Cristian Gabriel Beccaria, Facundo Fiocca Vernengo, María Carolina

Amezcu Vesely, Laura Almada, Juan Mucci, María Cecilia Ramello, Jimena Tosello Boari, Oscar Campetella, Carolina Lucia Montes, Eva Virginia Acosta Rodriguez, Adriana Gruppi. LXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Buenos Aires, Argentina.

Septiembre de 2017. *Galectin-3 deficiency drives lupus-like disease by promoting spontaneous germinal centers formation via IFN- γ* . CG Beccaria, F Fiocca Vernengo, MC Amezcu Vesely, MC Ramello, J Tosello Boari, M Gorosito Serrán, J Mucci, O Campetella, EV Acosta Rodriguez, CL Montes and A Gruppi. 19th International Conference on Lymphatic Tissues and Germinal Centres in Immune Reactions (GCC). September 14-17, 2017, San Servolo Island, Venice – Italy. Organizers: Stefano Casola (IFOM, IT) and Sidonia Fagarasan (IMS Riken, JP).

Noviembre de 2016. *Galectin-3 deficiency drives lupus-like autoimmune disease by promoting spontaneous germinal centers formation through an IFN γ -dependent mechanism*. Cristian Gabriel Beccaria, Facundo Fiocca Vernengo, Jimena Tosello Boari, Carolina Amezcu Vesely, M. Cecilia Ramello, Melisa Gorosito Serran, Juan Mucci, Oscar Campetella, Carolina Lucía Montes, Eva Virginia Acosta Rodriguez, Adriana Gruppi. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina.

Noviembre de 2016. *Galectin-3 deficiency drives lupus-like autoimmune disease by promoting spontaneous germinal centers formation*. Beccaria CG, Fiocca Vernengo F, Tosello Boari J, Ramello MC, Campetella O, Montes CL, Acosta Rodríguez EV, Gruppi A. LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Córdoba, Argentina.

Febrero de 2016. *Galectin-3 restrains spontaneous germinal centers formation preventing autoimmunity*. Cristian G. Beccaria, Facundo Fiocca Vernengo, María C. Amezcu Vesely, María C. Ramello, Jimena Tosello Boari, Melisa Gorosito Serrán, Juan Mucci, Eliane Piaggio, Oscar Campetella, Carolina L. Montes, Eva V. Acosta Rodríguez, Adriana Gruppi. Poster #1005. 2016 Keystone Symposia Conference. T Follicular Helper Cells and Germinal Centers (B4). Hyatt Regency Monterey, Monterey, California. United States of America.

Febrero de 2016. *Galectin-3 restrains spontaneous germinal centers formation preventing autoimmunity*. Cristian G. Beccaria, Facundo Fiocca Vernengo, María C. Amezcua Vesely, María C. Ramello, Jimena Tosello Boari, Melisa Gorosito Serrán, Juan Mucci, Eliane Piaggio, Oscar Campetella, Carolina L. Montes, Eva V. Acosta Rodríguez, Adriana Gruppi. Oral Presentation in Workshop 2 session. 2016 Keystone Symposia Conference. T Follicular Helper Cells and Germinal Centers (B4). Hyatt Regency Monterey, Monterey, California. United States of America.

Noviembre de 2015. *Galectin-3 restrains spontaneous germinal centers formation preventing autoimmunity*. Beccaria CG; Fiocca Vernengo, F; Amezcua Vesely, MC; Ramello, MC; Tosello Boari, J; Gorosito Serrán, M; Piaggio, E; Mucci, J; Campetella, O; Montes CL; Acosta Rodríguez, EV; Gruppi, A. I Meeting LASID-FAIC-SAI. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Buenos Aires, Argentina.

Noviembre de 2014. *Galectin-3 regulates germinal centers formation, autoreactive and long-lived antibody response*. Cristian Gabriel Beccaria, María Carolina Amezcua Vesely, Facundo Fiocca Vernengo, Melisa Gorosito Serrán, María Cecilia Ramello, Jimena Tosello Boari, Juan Mucci, Oscar Campetella, Carolina Lucía Montes, Eva Virginia Acosta Rodríguez, Adriana Gruppi. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina.

Noviembre de 2013. *Galectin-3 regulates the formation of Germinal Centers, PD-L1 expression in B cells and the generation of long-lived antibody secreting cells*. Cristian Gabriel Beccaria, María Carolina Amezcua Vesely, Facundo Fiocca Vernengo, Melisa Gorosito Serrán, María Cecilia Ramello, Jimena Tosello Boari, Carolina Lucía Montes, Oscar Campetella, Eva Virginia Acosta Rodríguez, Adriana Gruppi. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Los Cocos, Argentina.



Universidad
Nacional
de Córdoba



IMPACTO DE GALECTINA-3

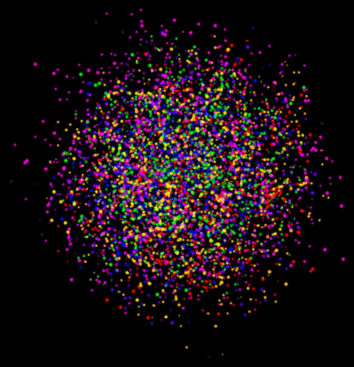
EN LA FORMACIÓN ESPONTÁNEA DE CENTROS GERMINALES

Cristian Gabriel Beccaria

Parte de los resultados de esta tesis doctoral están contenidos
en el artículo científico titulado

*“Galectin-3 deficiency drives lupus-like disease by promoting
spontaneous germinal centers formation via IFN- γ ”*

publicado el 24 de abril de 2018 en la revista Nature Communications ³²¹



Los Centros Germinales, estructuras microanatómicas transientes increíblemente dinámicas, son el escenario de expansión clonal de linfocitos B, diversificación de inmunoglobulinas y maduración de la afinidad; todos eventos claves en la generación de una respuesta inmune humoral efectiva y duradera.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral proporcionan la primera evidencia de la participación de Galectina-3 como molécula clave en la reacción de centro germinal.

Los ratones deficientes en Galectina-3 generan centros germinales espontáneos, desarrollan hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos, producen cantidades excesivamente elevadas de IFN- γ y experimentan una enfermedad autoinmune de características similares al lupus. IFN- γ resulta fundamental para inducir y mantener estas alteraciones ya que al bloquearlo, se reduce la formación espontánea de centros germinales y se previene la condición autoinmune.

En conjunto, nuestros datos proporcionan evidencia de que Galectina-3 regula la reacción de centro germinal a través de IFN- γ y señalan el potencial de Galectina-3 como objetivo terapéutico en enfermedades autoinmunes.