

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.



Inmunología
Centro de Investigaciones en Bioquímica
Clínica e Inmunología
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Inmunobiología de los Linfocitos B1: Rol de FcγRIIb y
BAFF en el control de la supervivencia de los mismos”**

Bioquímica María Carolina Amezcua Vesely.

Director de Tesis: Prof. Dra. Adriana Gruppi

Córdoba, Argentina 2012

Comisión Asesora: Dra. Claudia C. Motran

Dr. Hugo J.F. Maccioni

Dr. José L. Daniotti

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen	3
Introducción.....	8
Objetivos.....	30
Resultados.....	33
Resultados I.....	34
Resultados II	46
Resultados III.....	56
Resultados IV.....	65
Discusión	80
Materiales y Métodos	94
Producción Científica	115
Referencias Bibliográficas.....	118

Abreviaturas

Acs: Anticuerpos

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

Ags: Antígenos

APRIL: “a proliferation-inducing ligand” perteneciente a la superfamilia del TNF

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASB: Albumina sérica bovina

B1e: Linfocito B1 esplénico

B1p: Linfocito B1 peritoneal

B2e: Linfocito B2 esplénico

B2p: Linfocito B2 peritoneal

BAFF: “B cell-activating factor” perteneciente a la superfamilia del TNF

BAFF-R: Receptor de “B cell-activating factor”

BCMA: B cell maturation Antigen

BCR: Receptor de la célula B

CG: Centro Germinal

CP: célula/s plasmática/s

EF: Extrafolicular

ELISA: “Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay” o Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FE: Focos extrafoliculares

FO: Folículo

FSC: Dispersión de luz hacia adelante

Ig/s: Inmunoglobulina/s

INF-gamma: Interferón gamma

LES: Lupus eritematoso sistémico

Li: Linfocito

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

PALS: Manto linfoide periarteriolar

PBS: Solución tampón de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

POD: peroxidasa

rpm: revoluciones por minuto.

SBF: Suero bovino fetal

SSC: Dispersión de luz hacia el costado

TACI: Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor

Tg: Transgénicos

TLR: Receptores de tipo Toll

ZM: Zona Marginal

Resumen

Los LiB1 representan una población particular de linfocitos B que pueden ser distinguidos de los LiB convencionales (LiB2) por su fenotipo, localización anatómica y propiedades funcionales. Estas células representan solo una pequeña fracción de los LiB esplénicos, pero constituyen una población mayoritaria en cavidad pleural y peritoneal. La localización diferencial de los LiB1 les permite ser uno de los primeros tipos celulares que interaccionan con patógenos que atraviesan el epitelio intestinal. Los LiB1 producen la mayoría de la IgM sérica y mucha de la IgA presente en el epitelio intestinal. Estas células tienen un repertorio de BCR (de la sigla en inglés B Cell Receptor, receptor para antígeno de los linfocitos B) enriquecido en poli-especificidades de baja afinidad para una amplia variedad de antígenos. Por todo lo mencionado anteriormente, se sabe que los LiB1 juegan un rol crucial en la temprana y eficiente remoción de patógenos, lo que concomitantemente facilita una óptima transición entre la inmunidad innata y adaptativa.

Los LiB1 secretan espontáneamente Inmunoglobulinas (Igs) y, en comparación con los LiB2, tienen una cinética más rápida para secretar anticuerpos cuando son activados con lipopolisacárido bacteriano (LPS). Aumentos en el compartimiento de LiB1 se han asociado a fenómenos autoinmunes. Así, altos números LiB1 están presentes en cepas de animales que desarrollan enfermedades autoinmunes, como los ratones NZB/W. Se observó que en animales deficientes en la proteína SPA-1, hay un aumento en la población de LiB1 y dicho incremento está acompañado de elevados títulos de anticuerpos contra ADN junto a una nefritis, similar a la que se presenta en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Se observó que animales deficientes en CD22 y en Siglec-G presentan un gran incremento en el número de LiB1 y desarrollan autoinmunidad. Por ello, la identificación de factores reguladores capaces de controlar diferencialmente la expansión y supervivencia de LiB1,

podrían ser importantes herramientas a manipular durante el progreso de una deletérea respuesta autoinmune.

En los últimos años, FcγRIIb, receptor para porción Fc de la IgG de tipo inhibitorio, emergió como un posible mediador de la supervivencia de los LiB. Este receptor es expresado, como muchos de los receptores para la porción Fc de IgG, sobre células mieloides. Sin embargo, FcγRIIb es el único receptor para la porción Fc de la IgG expresado por los LiB. Durante el proceso de diferenciación de los LiB en células plasmáticas, se observó la disminución de la expresión de muchos marcadores de linaje de LiB como CD19, B220, Igs, etc. FcγRIIb es uno de los pocos receptores que no disminuyen su expresión durante este proceso. Por otra parte, es conocido que el solo entrecruzamiento de FcγRIIb induce apoptosis de los LiB y de células plasmáticas (CP). FcγRIIb une complejos inmunes y gatilla así la apoptosis de LiB. Este proceso ocurre de manera independiente de BCR. Podemos concluir entonces que la habilidad de FcγRIIb para inducir la apoptosis de los LiB, tiene la potencialidad de actuar en distintos puntos durante etapas de proliferación y diferenciación de estas células. Consecuentemente, la deficiencia de FcγRIIb puede contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes como LES, artritis reumatoidea y encefalitis autoinmune experimental.

Por otra parte, es conocido que miembros de la familia de factor de necrosis tumoral (TNF), como CD40 y Fas juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la supervivencia de LiB. Recientemente, se ha identificado a BAFF, (factor activador de linfocitos B perteneciente a la familia TNF, de la sigla en inglés, B cell Activating Factor) también conocido como BLyS, como una citoquina que influye sobre la supervivencia de los LiB. La manipulación de la expresión de BAFF en animales de experimentación llevó a concluir

que alteraciones en la expresión de dicha citoquina tiene consecuencias en la homeostasis de los LiB. Se observó que elevados niveles séricos de BAFF, no solo en animales de experimentación sino también en humanos, se asocian con fenómenos de autoinmunidad mediada por anticuerpos y con una alterada selección negativa de Linfocitos B.

En este trabajo de tesis identificamos que:

- Los LiB1 expresan altos niveles de FcgammaRIIb y son más susceptibles, que los LiB2, a la muerte mediada por este receptor.
- FcgammaRIIb regula la supervivencia de los LiB1 in vivo.
- La expresión de FcgammaRIIb en LiB1 es regulada por ligandos de Receptores Tipo Toll (TLR), IL4 y BAFF.
- BAFF protege a los LiB1 peritoneales de la apoptosis inducida vía FcgammaRIIb.
- Los LiB1 peritoneales provenientes de animales BAFF-Tg presentan niveles disminuidos de FcgammaRIIb en condiciones de "reposo" y de activación, y se encuentran protegidos de la muerte mediada vía FcgammaRIIb.

Los datos obtenidos posicionan a FcgammaRIIb como un receptor clave en el control de la supervivencia de Linfocitos B1. Su expresión puede ser regulada por una citoquina importante en patologías autoinmunes mediadas por Acs como es BAFF. Con vista al emergente rol que poseen moléculas capaces de bloquear *in vivo* la actividad de BAFF, la corrección de los niveles de expresión de FcgammaRIIb con estos agentes farmacológico, provee un efecto adicional, para poder interferir con la patogénesis de procesos autoinmunes y restaurar de esta manera la tolerancia hacia lo propio.

Palabras Claves:

Linfocitos B1

FcgammaRIIb

BAFF

Introducción

Protagonistas de la Respuesta inmune humoral: anticuerpos y linfocitos B

La tasa de eliminación y neutralización de microorganismos es de importancia crítica para la supervivencia del hospedador infectado, ya que ella determina la evolución de la infección. Entre las moléculas efectoras del sistema inmune los anticuerpos (Acs) son, sin lugar a dudas, cruciales para el control de infecciones producidas por microorganismos extracelulares o en los que su ciclo de vida transcurre con una etapa extracelular. Claras evidencias de esto se encontraron en la naturaleza cuando se reportó que niños que tenían dificultades para producir inmunoglobulinas (Igs) eran muy susceptibles a las infecciones, las cuales frecuentemente resultaban fatales (Gitlin y col., 1956; Ramesh y col., 1995). Los Acs pueden también tener un rol patogénico ya que Acs que reconocen componentes propios del hospedador (Acs autoreactivos) están involucrados/asociados con patologías autoinmunes (Martin y Chan, 2004).

El estudio de los Acs se remonta al año 1890, cuando los científicos Emil Adolf von Behring y Shibasaburo Kitasato descubren moléculas de Acs en el suero de animales inmunizados y demuestran que esos Acs, a los que ellos inicialmente llamaron “antitoxinas”, podían neutralizar las toxinas diftéricas y tetánicas. De manera interesante demostraron que estas moléculas poseían especificidad, ya que “la antitoxina tetánica no pudo neutralizar la toxina diftérica y viceversa” (Behring y Kitasato, 1965; Kantha, 1992). Luego de estos descubrimientos y durante muchos años, los inmunólogos creyeron que todas las células del organismo eran capaces de producir Acs. En el año 1935 McMaster demuestra que luego de una estimulación antigénica, los ganglios linfáticos drenantes eran

los sitios en donde se generaban los Acs (McMaster y Hudack, 1935). Luego en el año 1955 Coons y col (Coons y col., 1955) observaron que unas células particulares, a las cuales ellos llamaron células plasmáticas (CP), eran las responsables de la secreción de los Acs. Sin embargo, este grupo de científicos nunca imaginó que estas células plasmáticas derivaban de linfocitos (Li) B que habían sido activados. Recién en el año 1969 Ellis y col demuestran que las células plasmáticas se originaban a partir de la diferenciación de LiB activados (Ellis y col., 1969).

Luego de varios años de estudio, se pudo concluir que las CP derivan de LiB maduros los cuales han sido clasificados en convencionales (B2), CD5+ (B1) y LiB de zona marginal (ZM). Estas subpoblaciones de LiB presentan diferentes fenotipos y localización topográfica sugiriendo que pueden responder o ejercer sus funciones acorde a las necesidades de cada espacio biológico (Berland y Wortis, 2002). Estas funciones involucran no solo la producción de Acs sino también la presentación de antígenos (Ags) y la regulación, a través de la producción de citoquinas, de otras poblaciones celulares (Acosta-Rodriguez y col., 2007b; Lund y Randall, 2010; Mauri y col., 2003) Los estímulos que actúan sobre los LiB y que condicionan sus funciones pueden ser: Ags reconocidos de forma específica vía el “B cell receptor” (BCR), ligandos de receptores tipo Toll (TLR) y/o la interacción con LiT, células dendríticas y macrófagos.

Entre los LiB maduros, los LiB de ZM y los LiB1 parecen ser evolutivamente seleccionados y mantenidos para disponer de una fuente de producción de Acs rápida luego del ingreso de patógenos. Estas células responden rápidamente produciendo una primera onda de Acs necesarios para controlar la replicación de microorganismos. Se ha propuesto que los LiB de ZM y los LiB1 son un nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Los LiB maduros pueden ser distinguidos fenotípicamente en base a la expresión de diferentes moléculas de superficie, como se indica a continuación:

- LiB2: $IgM^{int}IgD^{alto}CD21^{int}CD23^{alto}$
- LiBZM: $IgM^{alto}IgD^{bajo}CD21^{alto}CD23^{bajo}$
- LiB1: $CD5^{+/-}CD11b^{+}IgM^{alto}IgD^{bajo}CD21^{-}CD23^{-/bajo}$

Con respecto a la ubicación topográfica es conocido que los LiB2 se encuentran en órganos linfáticos secundarios como el bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer y tejido linfoide asociado a mucosas formando estructuras organizadas denominados folículos.

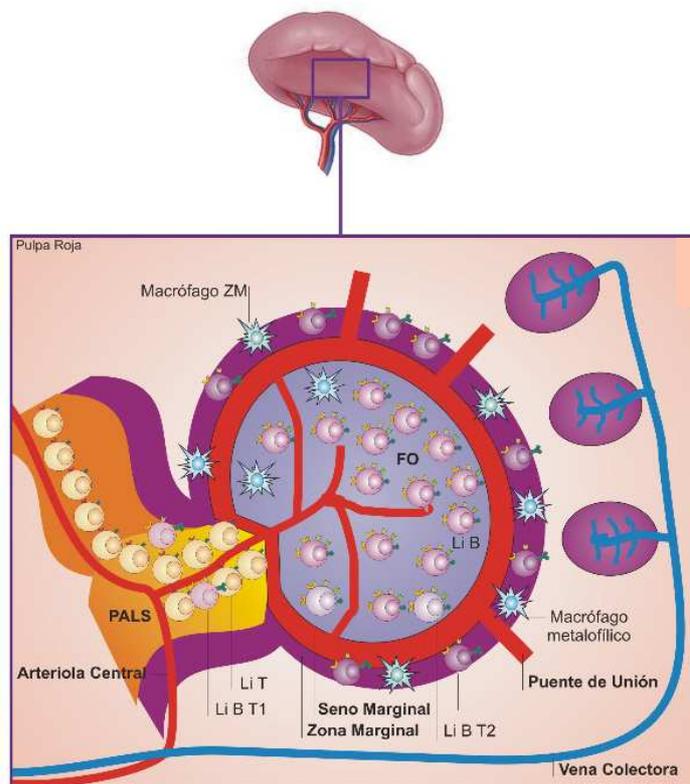


Figura II: Esquema de distribución de los LiB y T en el bazo, donde se observan LiB maduros, rodeados por la ZM. Se observa la arteriola central rodeada de LiT formando el PALS, en donde

también se ubican los LiB transicionales tipo I. En rojo está graficada la arteriola colectora y en azul la vena colectora. LiB T1: LiB Transicional tipo I, LiB T2: LiB Transicional tipo II, FO: Folículo.

Asimismo, es posible encontrar LiB2 maduros en medula ósea (Cariappa y col., 2005; Sapoznikov y col., 2008) y en sangre, ya que un alto porcentaje de estas células recirculan por el organismo. Por su parte los LiBZM se ubican en la zona marginal del bazo. Los LiB1 fueron descritos por primera vez, en el año 1983, como una pequeña población de LiB presentes en bazo que expresaban un marcador de LiT, la molécula CD5 o Ly5.1. Luego se demostró que la población de LiB1 se encontraba particularmente enriquecida en las cavidades peritoneal y pleural, y que esta población celular estaba compuesta por células que podrían expresar o no la molécula CD5 (LiB1a, LiB1b respectivamente). El hecho de que los LiB1 adquieran esta denominación se debe a que estas células se desarrollan ontogénicamente más temprano que los LiB2 (Godin y col., 1993).

En cuanto a la activación de las distintas subpoblaciones linfocitarias B, como previamente se mencionó, los LiB de ZM y los LiB1 presentan un umbral de activación menor que los LiB2, respondiendo rápidamente a señales externas y generando así una primera ronda de CP y Acs, sin la colaboración de células T (Fairfax y col., 2007; Lopes-Carvalho y Kearney, 2004). Esta característica los convierte en partícipes de una primera barrera de defensa contra patógenos, como bacterias (Alugupalli y col., 2003; Boes y col., 1998), virus (Baumgarth y col., 2000; Baumgarth y col., 1999) y nematodos (Paciorkowski y col., 2000).

Es importante señalar que los LiB pueden activarse de manera T-dependiente o T-independiente, dependiendo del requerimiento de ayuda por parte de los LiT cooperadores

(CD4+) para la producción de Acs (Mond y col., 1995). Los Ags T dependientes son proteínas que pueden ser procesadas por células presentadoras de Ag y presentadas asociadas a las moléculas clase II del MHC, para ser reconocidas por los LiT a través de su receptor específico para el antígeno (TCR). En una respuesta T-dependiente, tanto los LiB como los T se activan luego del reconocimiento del Ag por sus receptores específicos y se dirigen hacia el límite entre las zonas T y B, donde los LiB proliferan como consecuencia de señales derivadas de LiT CD4⁺ específicos. Estas células B activadas puede migrar hacia los puentes de unión entre la pulpa blanca y roja, y de allí hacia la pulpa roja del bazo y formar focos extrafoliculares (EF) de células plasmáticas, los cuales, como su nombre lo indica, se ubican fuera de los folículos. Estas células plasmáticas EF son capaces de secretar Acs que han sufrido cambio de isotipo (IgG) o no (IgM), pero que no sufrieron hipermutación somática (MacLennan y col., 2003). Por otra parte, los LiB activados también pueden dirigirse a los folículos y formar los conocidos centros germinales (CG), donde se produce cambio de isotipo de Igs, hipermutación somática y maduración de la afinidad, eventos que conducirán no solo a la generación de Acs de alta afinidad sino también al desarrollo de memoria inmunológica (Wolniak y col., 2004).

Por otro lado los Ags T independientes se dividen en dos grande grupos, Ags T independientes tipo I, y Ags T independientes tipo II. Los primeros son estímulos mitogénicos como por ejemplo LPS, CpG o poly-IC, los cuales generan una activación policlonal de los LiB vía TLR (Alugupalli y col., 2007). Por el contrario, los Ags T independientes tipo II comprenden, en general, a polisacáridos derivados de bacterias capsulares, virus, hongos o parásitos que entrecruzan una alta cantidad de receptores de los LiB (BCR) induciendo una respuesta antígeno específica. En el bazo, estos Ags son capaces de producir la activación de los LiB de ZM, quienes proveen una defensa de tipo

“innate-like” contra bacterias, diferenciándose a CP de corta vida en focos EF (Balazs y col., 2002; Lopes-Carvalho y Kearney, 2004; Martin y Kearney, 2002; Pillai y col., 2005)

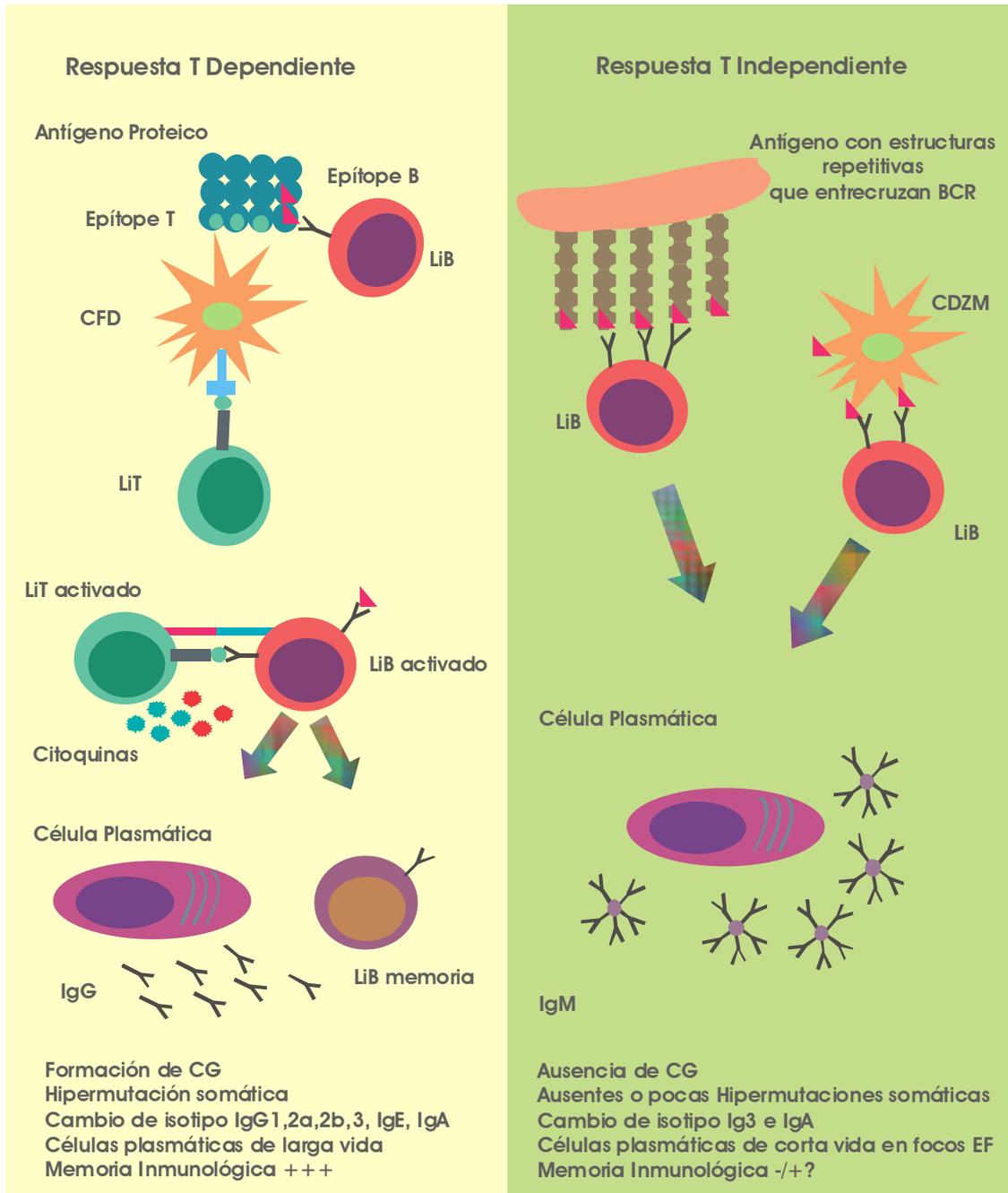


Figura I2: Representación esquemática de la generación de una respuesta inmune T-dependiente (izquierda) y T-independiente (derecha). CG: centro germinal.

En lo que concierne a la respuesta de Acs generada por los LiB1 peritoneales, cabe destacar que estas células son las principales productoras de Acs naturales, los cuales presentan especificidades contra moléculas conservadas en distintos agentes patógenos y por ello protegen de forma rápida y eficaz frente infecciones virales y bacterianas (Zhou y col., 2007) Se postula que este tipo de Acs no necesita de la presencia de bacterias comensales en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (Bos y col., 1989; Haury y col., 1997). Por otro lado, se conoce que los LiB1 que residen en cavidad peritoneal, al recibir señales de peligro, como por ejemplo la estimulación *in vivo* con LPS, disminuyen en su superficie la expresión de moléculas de anclaje a la cavidad peritoneal (CD9, afa4 beta 1, alfa 6 etc) y migran ya sea hacia ganglios linfáticos (Choi y Baumgarth, 2008; Itakura y col., 2005) o hacia un tejido llamado omentum o mesenterio, en el cual se organizan formando estructuras similares a los folículos presentes en bazo y que reciben el nombre de “milky spots” (Fagarasan y col., 2000; Ha y col., 2006; Rangel-Moreno y col., 2009). El omentum es una membrana serosa que une el páncreas, el bazo, el estómago y el intestino con las paredes posteriores del abdomen, dando así posicionamiento a estos órganos (Williams y White, 1986). Ya sea en los “milky spots” del omentum o en los ganglios linfáticos, los LiB1 pueden proliferar y diferenciarse a células secretantes de Acs. Se debe recalcar que el destino de las células plasmáticas generadas a partir de la diferenciación de LiB1, no se conoce. Sin embargo, podría especularse que a través de un gradiente de quemoquinas estas células podrían volver a la cavidad peritoneal o de manera contraria podrían morir en los “milky spots” o en los ganglios linfáticos donde quizás adquirieron el fenotipo de una CP de corta vida.

Nosotros estamos particularmente interesados en estudiar la inmunobiología de los LiB1 ya que estas células y los Acs producidos por ellas no solo participan en la resistencia

a infecciones (Martin y col., 2001) sino también están involucrados en regulación inmune (Szczepanik y col., 2003), en “clearance” de células envejecidas o apoptóticas (Shaw y col., 2000) como así también en la patogénesis de procesos autoinmunes (Baumgarth, 2011; Murakami y col., 1992)

Desarrollo de los LiB1

Para poder comprender las funciones de los LiB1, es importante conocer la ontogenia de los mismos. Sin embargo, hasta el momento no está del todo dilucidado el mecanismo que opera durante el desarrollo de estas células. Dos modelos han sido propuestos para explicar el origen de los LiB1. Por un lado el grupo de la Dra. Leonore Herzenberg postula que los LiB1 y los LiB2 derivan de distintos precursores (Hipótesis de Linaje) (Hayakawa y col., 1985; Kantor y col., 1992) y por otro lado el Dr. Klaus Rajewsky postula que ambos tipos de LiB derivan del mismo progenitor, pero que dependiendo de las señales que reciben a través de su BCR, las células se diferenciarán en LiB1 o LiB2 (Hipótesis de diferenciación inducida o de selección) (Lam y Rajewsky, 1999). Los LiB1 se generan de manera eficiente antes y después del nacimiento, durante las primeras semanas de vida. Precursores de LiB1a han sido encontrados en la región esplacnopleural de embriones de ratones de 8,5 días (Godin y col., 1993). Es conocido que el hígado fetal, pero no la médula ósea, es una fuente importante de LiB1a (Herzenberg, 2000). Por otro lado, los precursores de los LiB1b no fueron encontrados en la región esplacnopleural embrionaria (Godin y col., 1993); no obstante estas células pueden ser reconstituidas por precursores presentes no solo en hígado fetal sino también en médula ósea. En contraste al permanente aporte de LiB2 por parte de médula ósea, una vez que los LiB1 poblaron la cavidad peritoneal y pleural, en condiciones fisiológicas, no habría un influjo importante de LiB1 durante la vida adulta. En esta instancia surge la pregunta acerca del mantenimiento de esta población celular tan particular. Se postula que los LiB1 se mantendrían a través de un proceso de auto-generación, por el cual los LiB1 vía la secreción de IL-10 se expanden

para poder compensar la pérdida de células apoptóticas, y mantener de esa manera una población estable en el tiempo (Ishida y col., 1992; O'Garra y col., 1992). Se postula que la inhibición del influjo de nuevas células podría estar, en parte, regulada por la IgM secretada por los LiB1, ya que animales que tienen defectos en la secreción de IgM poseen un incrementado número de LiB1 peritoneales (Boes y col., 1998). Por su parte, si se alteran las condiciones fisiológicas, como en el caso de una depleción de LiB1, ya sea por irradiación o por ablación química, estas células pueden ser reconstituidas por precursores provenientes de médula ósea (Duber y col., 2009; Holodick y col., 2009a). Cabe destacar que este proceso de repoblación de los LiB1 es mucho más lento que para los LiB2 (Montecino-Rodriguez y col., 2006).

En la década del 90 se demostró que los LiB1 usan un número limitado de genes para expresar la cadena pesada de Igs comparados con los LiB2, y por consiguiente tienen un repertorio de regiones variables de la cadena pesada de Igs menos diverso que los LiB2 (Tornberg y Holmberg, 1995). Es conocido que la expresión de desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), enzima necesaria para la introducción de nucleótidos durante el proceso de recombinación de los genes de Igs, comienza luego del nacimiento (Gregoire y col., 1979). Este dato acuerda con la hipótesis de Linaje, acerca del origen fetal de los LiB1 y la capacidad de auto-mantenimiento de los mismos durante la vida adulta. Sin embargo, el grupo del Dr. Rajewsky demostró que había inserción de algunos nucleótidos en los genes de Igs de los LiB1, consecuentemente este dato indicaría que habría un porcentaje de LiB1 que son aportados durante la vida adulta y que los precursores de esta población, en particular, provendrían de médula ósea (Gu y col., 1990).

Los LiB1 secretan espontáneamente IgM, y se encuentran numéricamente incrementados en ratones NZB/NZW los cuales están predispuestos a desarrollar

autoinmunidad (Hayakawa y col., 1983). Estas células secretan anticuerpos específicos contra Ags propios, como por ejemplo lípidos oxidados (Chou y col., 2009) o Ags expresados sobre células apoptóticas (Kulik y col., 2009). Asimismo, los Acs derivados de los LiB1 tienen especificidad para reconocer moléculas expresadas por distintos patógenos como fosforilcolina de bacterias Gram+, LPS de bacterias Gram-, y varios Ags expresados por distintos virus y parásitos (Racine y Winslow, 2009). Estos Acs poli-reactivos, producidos por los LiB1, conforman el repertorio de Acs naturales. Se ha postulado, que este repertorio se genera en ausencia de estímulos antigénicos (Bos y col., 1989; Haury y col., 1997) y se ha demostrado que la especificidad antigénica es un determinante crucial para el desarrollo y la función de los LiB1. La baja afinidad de los Acs contra Ags propios, producidos por los LiB1, podría permitir a estas células evadir el proceso de selección negativa y así contribuir al desarrollo de autoinmunidad. Sin embargo, la evasión de la selección negativa no explica el enriquecimiento del repertorio auto-reactivo de los LiB1. En el año 1999 el grupo del Dr. Richard Hardy, demostró que los LiB1 productores de autoanticuerpos son seleccionados de manera positiva, justamente por su reactividad contra lo propio (Hayakawa y col., 1999). En dicho trabajo demostraron que ratones deficientes en la proteína Thy1 (también conocida como CD90) no poseen LiB1 ni Acs específicos contra Thy1, los cuales están presentes en ratones salvajes. Este proceso de selección positiva de los LiB1 auto-reactivos estaría restringido solo a esta población celular y nos habla de la importancia de la especificidad del BCR en el desarrollo de los LiB1. Otra evidencia a favor de la hipótesis de diferenciación inducida, proviene de estudios que indican que la fuerza de la señal vía el BCR, es un factor determinante para la selección de los LiB1 (Casola y col., 2004). Reportes previos indican que la eliminación de reguladores positivos de la señal del BCR, o de moléculas co-estimuladoras, resultan en una disminución o

eliminación de LiB1. Por el contrario, la remoción de reguladores negativos de la señal del BCR, lleva a un incremento en el número de LiB1 (Berland y Wortis, 2002). Por lo tanto, la señal de reconocimiento de Acs propios a través del BCR sería un evento de selección positiva esencial para el desarrollo de los LiB1. Este proceso de selección positiva de los LiB1, del mismo modo, concuerda con la existencia de un repertorio similar de Acs naturales en todos los individuos, a pesar del hecho de que la generación de Acs involucra un mecanismo estocástico de recombinación de los genes de las cadenas de Igs. La reciente identificación de un precursor ubicado en médula ósea y en hígado fetal, el cual da origen específicamente a LiB1 es una fuerte evidencia que apoya la hipótesis del linaje en el desarrollo de los LiB1 (Montecino-Rodriguez y col., 2006). Sin embargo este hallazgo no resuelve del todo el desarrollo de los LiB1, y no prevé que bajo ciertas condiciones fisiológicas, los precursores de los LiB2 pueden dar origen a LiB con todos los atributos que poseen los LiB1. Por ello se podría pensar que las 2 hipótesis propuestas para explicar el desarrollo de los LiB1 no son mutuamente excluyentes, sino que los fenómenos que apoyan ambas pueden coexistir, de manera tal de asegurar el desarrollo y mantenimiento de la población de LiB1 durante todas las etapas de la vida (fetal y adulta). Conciliando las hipótesis se podría plantear que el pool de LiB1 se genera durante la vida fetal y en las primeras semanas de vida. Una vez que esta población es generada, se inhibe el desarrollo de la misma a través de un mecanismo de regulación negativa. Esta población es mantenida entonces por el proceso de auto-renovación y por la secreción de citoquinas (Moon y col., 2004; O'Garra y col., 1992; Vink y col., 1999). Con el tiempo, precursores de médula ósea contribuirían con el pool de LiB1, de esta manera se ampliaría el repertorio de los LiB1, particularmente el de los LiB1b, en los cuales se han observado inserciones de nucleótidos en la región CDR3 (region hiper-variable de las Igs). También durante esta etapa se

seleccionarían positivamente los LiB1a que reconocen Ags propios, predominantes en la vida fetal.

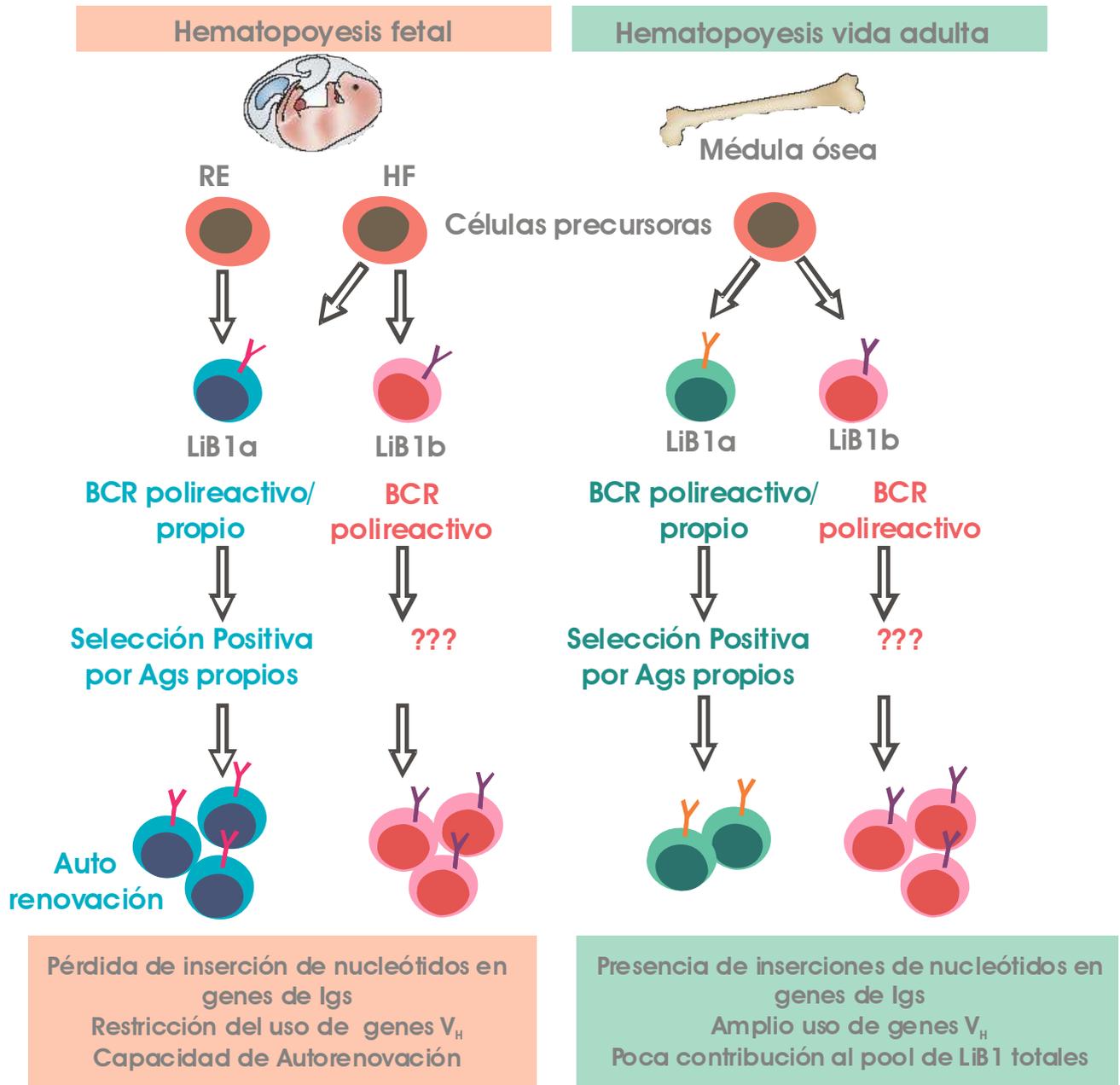


Figura I3: Esquema representativo de la ontogenia de los LiB1. **RE:** región esplacnopleural, **HF:** hígado fetal. **???:** Mecanismo desconocido.

Características funcionales de los LiB1

Los LiB1 y los LiB de ZM presentan un umbral de activación menor que los LiB2 y por ello responden rápidamente a señales externas, generando una primera onda de CP y Acs sin la cooperación de los LiT. Este tipo de respuesta, tal como mencionamos previamente, se denomina *Timo independiente*, y tiene un papel fundamental en la defensa durante las primeras etapas de las infecciones bacterianas (Martin y col., 2001). Si bien una de las características de la respuesta inmune humoral de tipo Timo independiente es la incapacidad para generar memoria inmunológica, durante ciertas infecciones se genera una respuesta Timo independiente que resulta en la expansión de una población de LiB1, la cual es capaz de diferenciarse a células de memoria confiriendo inmunidad por largo tiempo (Alugupalli y col., 2004; Gil-Cruz y col., 2009; Haas y col., 2005).

La población de LiB1 desde su identificación, hace más de 20 años, tanto en humanos como en animales de experimentación (particularmente ratones) (Hayakawa y col., 1983) ha atraído considerablemente la atención como posible contraparte normal de los LiB CD5+ que se encuentran presentes en pacientes con leucemia linfática crónica (Boumsell y col., 1978) y también por su asociación con la producción de autoanticuerpos (Casali y col., 1987; Hardy y col., 1987; Hayakawa y col., 1983) y patologías autoinmunes (Dauphinee y col., 1988).

Una característica que define a los LiB1 es su habilidad para secretar “Acs naturales” en ausencia de una inmunización o de una infección aparente (Baumgarth, 2011). Los LiB1 son la principal fuente de IgM presente en suero la cual, acorde al

repertorio descripto, reconoce polisacáridos bacterianos y algunos autoantígenos (Berland y Wortis, 2002).

Los LiB1 tienen la capacidad para diferenciarse a célula secretante de Acs en respuesta a estimulación con ligandos de TLR. Genestier y col. mostraron que la mayoría de los ligandos de TLR son capaces de estimular a todas las poblaciones de LiB (LiB2, LiB1, y LiBZM) e inducir en ellas una fuerte respuesta proliferativa. Sin embargo, solo los LiB1 y los LiBZM son capaces de diferenciarse a CP y secretar altos niveles de Igs en respuesta a este tipo de estímulo (Genestier y col., 2007).

Una de las características distintivas de los LiB1 es su incapacidad para proliferar en respuesta al entrecruzamiento del BCR. Algunos reportes indican que los LiB1 entran en apoptosis al ser estimulados vía su BCR (Bikah y col., 1996; Murakami y col., 1992). Sin embargo, otros autores demostraron que la supervivencia de estas células no se ve afectada por el entrecruzamiento del BCR (Morris y Rothstein, 1993). Otra explicación para la falta de respuesta a este estímulo podría estar relacionada a la expresión de la molécula CD5, la cual inhibiría la proliferación inducida a través de su receptor para el Ag (Sen y col., 1999). Cabe destacar que los LiB1b que no expresan CD5 tampoco proliferan en respuesta a la estimulación vía BCR (Sen y col., 2002). Recientemente se señaló a la molécula Siglec-1 como inhibidora de la vía de señalamiento del BCR, sin embargo LiB1 deficientes en esta molécula no recuperan una total capacidad proliferativa luego de la activación con anti IgM (Hoffmann y col., 2007). Por lo tanto, los mecanismos moleculares responsables de impedir la proliferación de los LiB1 inducida por el entrecruzamiento del BCR siguen siendo objeto de estudio. Conjuntamente, estos datos muestran que los LiB1 son células que no responden a la inducción de proliferación clonal mediada por el entrecruzamiento del BCR,

y que de manera particular, responden de forma superior no solo proliferando sino también produciendo Acs frente a los ligandos de TLR.

Es conocido que, durante la infección con el virus influenza, los LiB1a secretan grandes cantidades de IgM poli-reactiva a nivel del tracto respiratorio, sitio en el que comienza el proceso infeccioso. Los LiB1a responden a esta infección acumulándose en los órganos linfáticos regionales en respuesta, quizás, a señales innatas. En estos sitios los LiB1a se diferencian en células productoras de Acs, de las cuales solo el 10 % producen Acs dirigidos específicamente contra el virus. Sin embargo, este conjunto de Acs es importante para poder combatir esta infección viral. Por otra parte, en este mismo trabajo, se reportó que los LiB1b no solo que no se acumulan en los órganos linfáticos regionales, sino que tampoco contribuyen con la respuesta inmune antiviral (Choi y Baumgarth, 2008). A pesar de éste comportamiento, a los LiB1b se les atribuyen funciones particulares como la adquisición de memoria inmunológica. Por ejemplo, luego de la infección con la espiroqueta *B. hermsii* (Alugupalli y col., 2004), la inyección intra-peritoneal de la proteína OmpD de *Salmonella* spp (Gil-Cruz y col., 2009), o la inmunización con el polisacárido tipo 3 de neumococo (Haas y col., 2005), se observó una expansión Ag-específica de LiB1b. Más aun, cuando estas células eran transferidas en ratones inmunodeficientes ($Rag1^{-/-}$), las mismas eran capaces de proveer de una respuesta de Acs protectora luego del desafío con los distintos patógenos.

Homeostasis en el sistema inmune: control de la respuesta por apoptosis

El sistema inmune de cualquier individuo debe mantener un fino balance entre mecanismos activadores e inhibidores para poder así asegurar la defensa contra agentes patógenos, sin generar alteraciones que dañen al propio individuo. Es así que, la limitación de la respuesta inmune es un proceso necesario para mantener el equilibrio inmunológico.

Luego de la activación de los LiB, ya sea específica o policlonal, el sistema inmune pone en marcha distintos mecanismos de control con el objetivo de retornar a la homeostasis (Lenardo, 1997). Los reguladores mejor definidos de la apoptosis de las células B son el sistema Fas/FasL y las proteínas de la familia Bcl (Bossy-Wetzel y Green, 1999; Lenardo y col., 1999; Nagata y Golstein, 1995). Muchos trabajos han sido enfocados sobre los mecanismos moleculares por los cuales estas proteínas regulan la apoptosis. Es conocido que el entrecruzamiento de Fas (CD95) resulta en la formación de un complejo de señales que activa una familia de proteasas llamadas "caspasas" las cuales son responsables de inducir apoptosis en varios tipos celulares (Cleary y col., 1995; Henkart y Grinstein, 1996; Nagata y Golstein, 1995; Takahashi y col., 2001). La señal de muerte mediada por Fas-L en los LiB, puede ser aportada no solo por LiT activados sino también por LiB activados o por otras células del sistema inmune (Hur y col., 2000; Nowak y col., 2006; Rathmell y col., 1995; Rathmell y Goodnow, 1995; Zuniga y col., 2002). Distintos trabajos demuestran que ratones deficientes en Fas (lpr) o FasL (gld) presentan altos títulos de autoanticuerpos (Adachi y col., 1996; Izui y col., 1984) y desarrollan autoinmunidad (Davidson y col., 1986), lo cual revela que el sistema Fas-FasL controla la expansión no

solo de clones reactivos con componentes de microorganismos sino de clones autoreactivos. TRAIL e IFN gamma son otros mediadores de muerte celular programada que participan en el control de la homeostasis de la respuesta humoral convencional (Ursini-Siegel y col., 2002). Los mecanismos involucrados en el control de la respuesta inmune en la cual los LiB1 se ven involucrados, todavía no han sido dilucidados

Durante los últimos años resurgieron estudios relacionado con la biología de los LiB que aportaron la información de la que se dispone actualmente; sin embargo, muchos interrogantes permanecen en escena. Nosotros estamos particularmente interesados en conocer los mecanismos de control de los LiB1, ya que esta población celular presenta un umbral de activación muy bajo y son potenciales candidatos a sufrir una desregulación del ciclo celular. Dadas estas características, no es sorprendente que a estos Li se los haya involucrado en procesos autoinmunes (Fletcher y col., 2011; Ishida y col., 2006; Murakami y col., 1992) y en desórdenes linfoproliferativos como leucemia linfocítica crónica y linfomas (Caligaris-Cappio y col., 1982; Piris y col., 1998).

Rol de FcγRIIb en la inmunobiología de los LiB

Los receptores para la porción Fc de la IgG conforman una familia de moléculas que cumplen roles importantes en la promoción y regulación de respuestas inflamatorias, al ser capaces de gatillar distintos efectos luego de ser entrecruzados por sus ligandos, los complejos de Ags-Acs (Ravetch, 1994). La mayoría de estos receptores son de tipo activadores e incluyen los receptores tipo I, IIa, III, y IV. Por otro lado se encuentra el receptor FcγRIIb, el único que posee funciones inhibitorias. Los receptores activadores son expresados principalmente por células de origen mieloide, y median muchas de las funciones efectoras de estas células como por ejemplo la fagocitosis, citotoxicidad dependiente de Acs y liberación de mediadores inflamatorios, etc (Gerber y Mosser, 2001).

El receptor de tipo inhibitorio, FcγRIIb, es expresado por células de origen mieloide y es el único receptor para la porción Fc de la IgG expresado en los LiB. En células mieloides éste receptor inhibe su activación al disminuir las funciones efectoras mediadas por los receptores activadores mencionados anteriormente. En los LiB, los cuales solo expresan el FcγRIIb, éste receptor inhibe las señales activadoras provenientes de la interacción con el BCR. En este caso los inmuno-complejos que contienen Ags unidos a Igs, y que son reconocidos por el BCR, realizan el entrecruzamiento de este receptor y gatillan señales intracelulares que tienden a controlar la proliferación de los LiB. La unión conjunta del BCR con el FcγRIIb provee señales necesarias para frenar la respuesta

inmune en la cual se ha generado suficiente cantidad de Acs específicos contra un microorganismo.

Ha sido descrito también que el entrecruzamiento de FcγRIIb en ausencia de la señal vía BCR, induce la apoptosis de los LiB (Pearse y col., 1999). Distintos reportes en los cuales se utilizan animales deficientes en FcγRIIb con determinadas bases genéticas, ponen en evidencia el rol de este receptor en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Bolland y col., 2002), el Síndrome de Goodpasture (Nakamura y col., 2000), la Encefalitis autoinmune experimental (Iruetagoiena y col., 2008) y la Artritis inducida por colágeno (Yuasa y col., 1999). Ratones C57BL/6 deficientes en FcγRIIb desarrollan una enfermedad similar al LES en humanos, con hipergammaglobulinemia, presencia de Acs dirigidos contra estructuras nucleares, y depósito de complejos inmunes a nivel glomerular, lo que lleva a una falla renal progresiva seguida de muerte a los 9 meses de vida en el 50% de los animales. De manera interesante, la transferencia adoptiva de médula ósea de animales FcγRIIb^{-/-}, en animales inmunodeficientes (Rag-1^{-/-}) genera Acs anti-nucleares y glomérulo-nefritis, con lo cual el desarrollo de autoinmunidad estaría relacionado directamente a la pérdida de expresión de este receptor (Bolland y Ravetch, 2000). El mismo grupo de investigadores demostró que la restauración de la expresión de FcγRIIb, en animales deficientes en este receptor, o que tienen predisposición a desarrollar LES, lleva a una importante mejoría en el desarrollo de la patología autoinmune, con disminución en niveles de auto-Acs y de proteinuria (McGaha y col., 2005). De manera similar, recientemente se demostró que la sobre-expresión de FcγRIIb en LiB, en un modelo de animales que desarrollan espontáneamente LES,

puede disminuir la mortalidad de estos animales, y esto se atribuye a la menor cantidad de auto-Acs y a menores niveles de proteinuria (Brownlie y col., 2008).

Por otra parte, recientemente, se describió la importancia de FcgammaRIIb en el mantenimiento de la supervivencia de CP (Xiang y col., 2007). Las células plasmáticas son el último estadio de diferenciación alcanzado por los LiB, y estas células pueden ser de corta o larga vida, ubicándose ya sea en órganos linfáticos secundarios o a nivel de medula ósea, respectivamente. Cabe destacar que durante el periodo de diferenciación de un LiB hacia una CP se van perdiendo marcadores de linaje del LiB como lo son la IgM de superficie, B220, CD19 etc. Por lo tanto se hace difícil realizar la identificación de estas células. Xiang y col (2007) demostraron que CP tanto humanas como murinas expresan altos niveles de FcgammaRIIb y que la expresión de este receptor controlaría la persistencia de estas células en medula ósea. Un hallazgo interesante de este trabajo fue que las CP de animales predispuestos genéticamente a desarrollar LES expresan niveles reducidos de FcgammaRIIb. Asimismo, estos autores demuestran que líneas celulares provenientes de pacientes con mieloma múltiple expresaron altos niveles de FcgammaRIIb y a la vez fueron susceptibles a la muerte vía este receptor, indicando que el entrecruzamiento del mismo podría ser un buen tratamiento para este tipo de patologías. En base a la información disponible, en estos últimos años se planteó que pequeñas modificaciones a nivel de la expresión de FcgammaRIIb generarían cambios importantes en la patogénesis de procesos autoinmunes.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la participación de FcγRIIb, un receptor inhibitorio, en el control de la supervivencia de los Linfocitos B1 en condiciones fisiológicas y de activación.

Objetivos Específicos

- I) *Evaluar el rol de FcgammaRIIb en el control de la sobrevivencia de los Linfocitos B1 in vitro.*
- II) *Analizar la participación de FcgammaRIIb en el control de la sobrevivencia de Linfocitos B1 in vivo.*
- III) *Identificar estímulos capaces de modificar la expresión de FcgammaRIIb y consecuentemente la susceptibilidad de los linfocitos B1 a la apoptosis mediada por éste receptor.*
- IV) *Evaluar la participación de BAFF en el control de la sobrevivencia de Linfocitos B1 mediada por FcgammaRIIb.*

Resultados

Resultados I

Objetivo Específico

Evaluar el rol de FcγRIIb en el control de la supervivencia de los Linfocitos

B1 in vitro.

Con el objetivo de evaluar el rol de FcγRIIb en el control de la supervivencia de los Linfocitos B1, *in vitro*, uno de los primeros estudios que nos propusimos realizar fue analizar la expresión de FcγRIIb (CD32) en las distintas subpoblaciones de LiB células esplénicas. Para ello, células esplénicas obtenidas de ratones C57BL/6 fueron teñidas con anti-CD32/CD16 en combinación con anti-B220, anti-CD21, anti-CD23, anti-CD5, para identificar las distintas subpoblaciones de LiB presentes en bazo (LiB convencionales o B2, LiB ZM, LiB1 esplénicos) (Su y Rawlings, 2002). Los LiB1 peritoneales fueron identificados en base a la expresión de B220 y de CD11b (Hastings y col., 2006) y conjuntamente se agregó un anti-CD32/CD16. Se pudo observar que FcγRIIb es expresado por todas las subpoblaciones de LiB maduros, sin embargo el perfil de expresión varió entre las distintas subpoblaciones. La Figura 1A muestra, mediante un gráfico de barras, los valores de intensidad de fluorescencia media de FcγRIIb en las distintas poblaciones de LiB analizadas. Claramente se puede observar que LiB de bazo (LiB2, LiB ZM, LiB1) y LiB2 peritoneales expresaron niveles similares de FcγRIIb, mientras que los LiB1 peritoneales expresaron los mayores niveles de FcγRIIb. A modo representativo mediante histogramas de expresión se muestra la diferencia en expresión de FcγRIIb entre LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos (Figura 1B).

Teniendo en cuenta el elevado nivel de expresión de FcγRIIb en los LiB1, evaluamos si dicha expresión diferencial estaba circunscripta al receptor de la porción Fc de la IgG o si el tener niveles elevados de receptores asociados a muerte celular es privativo de los LiB1, sobre todo considerando el objetivo general de conocer moléculas responsables del control de la supervivencia de LiB1. En contraste a lo que sucede con la expresión de FcγRIIb, los niveles de Fas, importante receptor de muerte de los LiB

(Mizuno y col., 2003), determinados por citometría de flujo, fueron expresados de forma similar en LiB2 esplénicos y LiB1 peritoneales (Figura 1C).

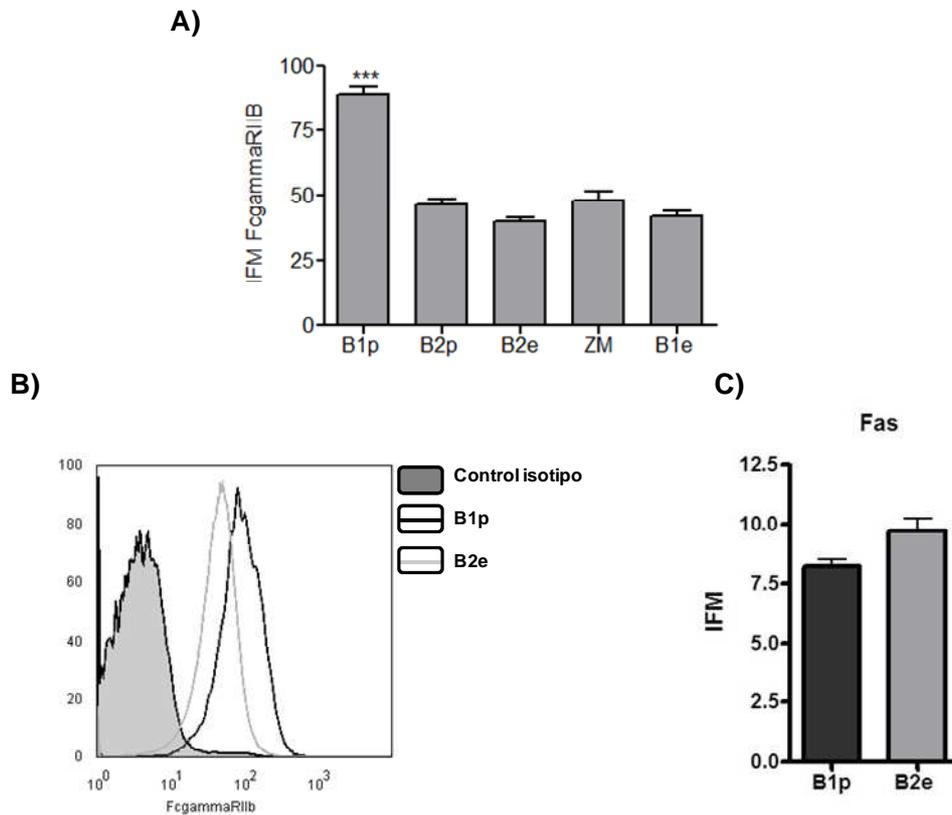


Figura 1: Expresión de FcγRIIb en distintas subpoblaciones de LiB

A) Intensidad de Fluorescencia media (IFM) +/- DS de la expresión de FcγRIIb en las distintas subpoblaciones de LiB (LiB1 peritoneales (B1p), LiB2 peritoneales (B2p), LiB2 esplénicos (B2e), LiB de zona marginal (ZM), LiB1 esplénicos (B1e)), evaluada ex vivo por citometría de flujo. **B)** Histograma representativo de la expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales (B1p línea negra) y en LiB2 esplénicos (B2e línea gris). El histograma lleno color gris representa el control de isotipo. En el eje de las X se observan los niveles de expresión de FcγRIIb y en el eje de las Y el porcentaje de células evaluado. **C)** Intensidad de Fluorescencia media (IFM) +/- DS de la expresión de Fas en LiB1 peritoneales (B1p) y LiB2 esplénicos (B2e), evaluada ex vivo por citometría de flujo. Los

resultados presentes en A-C son representativos de 5 experimentos independientes. *** $p \leq 0,001$.

A partir de los resultados de expresión de Fc γ RIIb en las distintas subpoblaciones de LiB y considerando a los LiB1 como células preactivadas (Baumgarth, 2011), surgió la inquietud de determinar si los mayores niveles de Fc γ RIIb expresados en LiB1 peritoneales se correlacionaban con un fenotipo de mayor activación de estas células y/o con un fenotipo de células secretantes de Acs. Para ello, la expresión de distintos marcadores de activación y de diferenciación característicos de célula secretante de Acs fueron evaluados en LiB1 y B2 peritoneales como así también en LiB2 de bazo, por citometría de flujo. Como puede observarse en la Figura 2A, tanto los LiB1 como los LiB2 peritoneales expresaron altos niveles de MHC II (IA^b) comparados con los LiB2 esplénicos. De modo interesante, observamos que altos niveles de la molécula co-estimuladora CD80 fueron expresados en un alto porcentaje en LiB1 peritoneales (81%), mientras que el porcentaje de LiB2 esplénicos y peritoneales que expresaron esta molécula es de un 37% y un 6% respectivamente (Figura 2B). En el año 2007 el grupo del Dr T Rothstein, de la Universidad de Boston (EEUU), reporta que una gran parte de la población de LiB1 peritoneales, de ratones de la cepa BALB/c, expresa en su superficie la molécula PDL-2 (Programmed Death-Ligand 2) y que la alta expresión diferencial de la misma en LiB1 estaría relacionada con características autoinmunes asociadas a estas células (Micolino y col., 1988). En base a esta información evaluamos la expresión de PDL-2 en las distintas subpoblaciones de LiB de ratones C57BL/6. En la Figura 2C puede observarse que los LiB1 peritoneales expresaron altos niveles de PDL-2 comparados con los LiB2 peritoneales y esplénicos, correlacionándose nuestros resultados con los datos previos de literatura (Kaku y Rothstein; Zhong y Rothstein, 2011; Zhong y col., 2007)

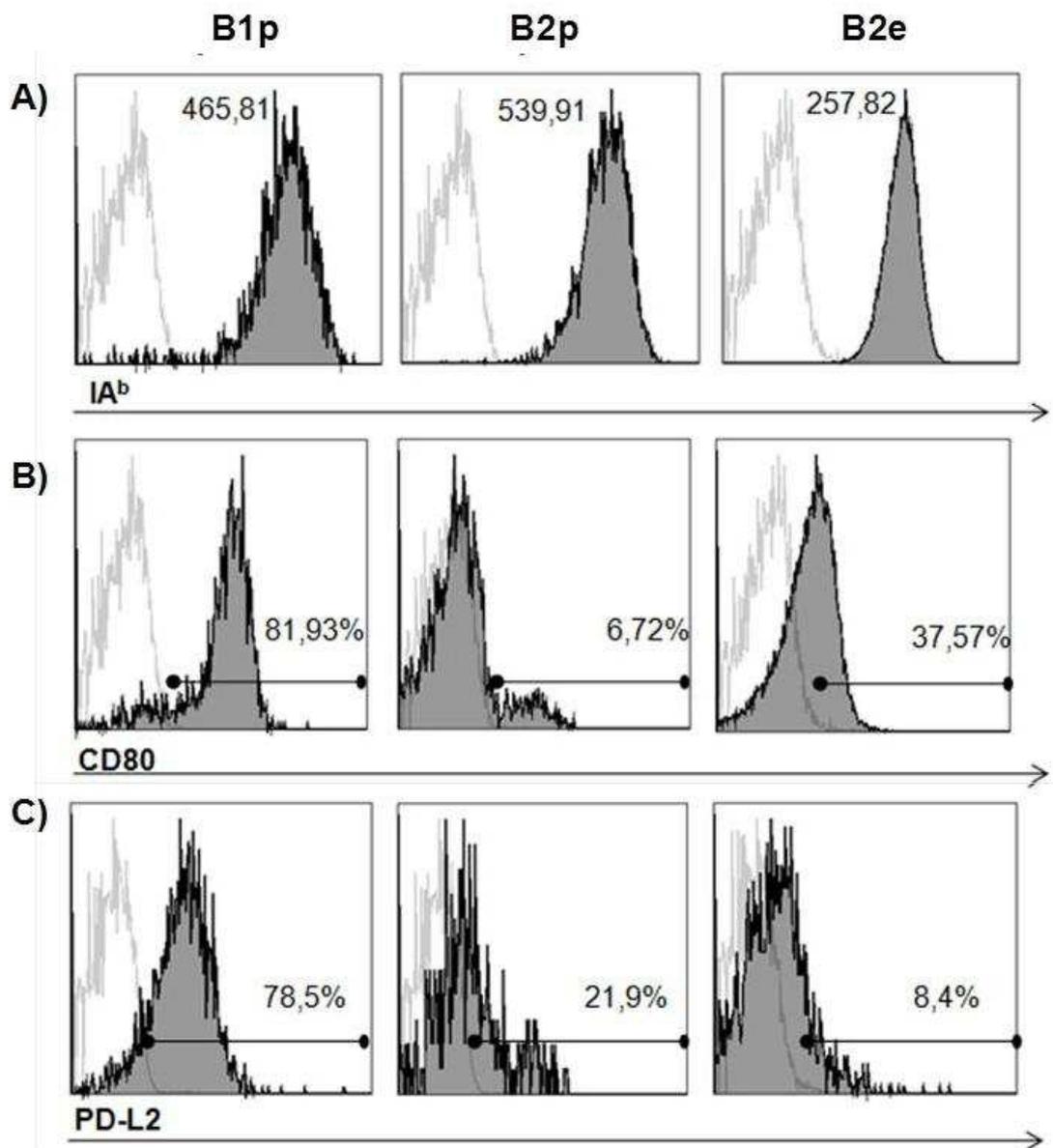


Figura 2: Expresión de marcadores de activación y de PDL-2 en las distintas subpoblaciones de LiB.

Expresión de A) MHC clase II (IA^b) B) CD80 y C) PDL-2 en LiB1 peritoneales (B1p), LiB2 peritoneales (B2p) y LiB2 esplénicos (B2e) evaluada por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de 2 experimentos independientes. Los números observados en cada histograma, representan en el caso de IA^b la Intensidad de Fluorescencia Media, y en el caso de CD80 y PDL-2 el porcentaje de células positivas para cada uno de estos marcadores.

Para determinar si los mayores niveles de expresión de FcγRIIb se correlacionaban con un fenotipo de célula secretante de Acs, la frecuencia de células secretantes de IgM y los niveles de expresión de IgM intracelular fueron evaluados en las distintas subpoblaciones de LiB. En la Figura 3A se muestra, tal como fue reportado previamente (Tumang y col., 2005), que la población de LiB1 contiene un número significativo de células secretantes de Acs de tipo IgM, determinada por Elispot, mientras que las poblaciones de LiB2 tanto esplénicos como peritoneales carecen de las mismas. Este resultado se correlacionó con la identificación de una población celular que expresó altos niveles de IgM intracelular en la población de LiB1 peritoneales, la cual estuvo ausente entre los LiB2 esplénicos y peritoneales (Figura 3B). Cabe destacar que todas las subpoblaciones de LiB expresaron IgM de forma intracelular, pero la población IgM^{high} fue solo hallada en la población de LiB1 peritoneales.

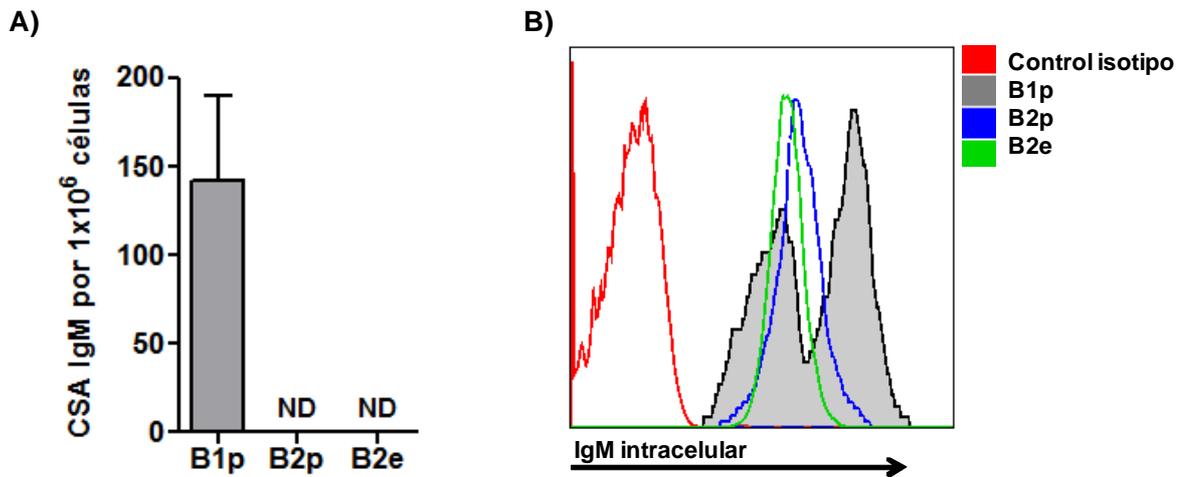


Figura 3: Frecuencia de células productoras de Acs y expresión de IgM intracelular en las subpoblaciones de LiB

A) Frecuencia de células secretantes de Acs (CSA) de isotipo IgM, determinado por ELISPOT, en LiB1 peritoneales (B1p), LiB2 peritoneales (B2p) y LiB2 esplénicos (B2e) **B)** Histograma representativo de la expresión de IgM intracelular, determinada por citometría de flujo en LiB1 peritoneales (histograma gris), LiB2 peritoneales (línea azul), y LiB2 esplénicos (línea verde). El histograma rojo representa el control de isotipo. ND: No detectable. Los resultados presentes en A-B son representativos de 2 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que los datos obtenidos indican que la población de LiB1 posee características de células secretantes de Acs/plasmoblastos o células plasmáticas, la expresión de Blimp-1, un factor de transcripción clave para el desarrollo de células secretantes de Acs, fue determinada por citometría de flujo en las distintas poblaciones de LiB. En la Figura 4 puede observarse que los LiB1 peritoneales expresaron mayores niveles de expresión de Blimp-1 que los LiB2 esplénicos y peritoneales. Este hallazgo concuerda con lo reportado en la literatura acerca de la expresión basal de Blimp-1 en LiB1 peritoneales, los cuales al ser estimulados con ligandos de receptores tipo Toll, tienen una

cinética de expresión de Blimp-1 más acelerada que los otros tipos de LiB (Fairfax y col., 2007).

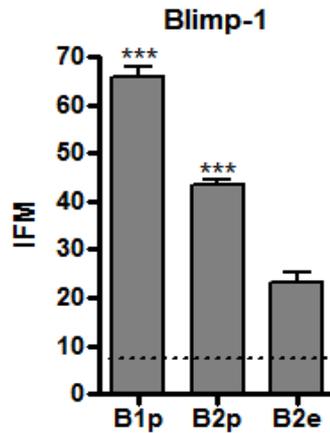


Figura 4: Expresión de Blimp-1 en las distintas subpoblaciones de LiB. Intensidad de Fluorescencia media (IFM) \pm DS de la expresión intracelular de Blimp-1 en LiB1 peritoneales (B1p), LiB2 peritoneales (B2p) y LiB2 esplénicos (B2e), evaluada ex vivo por citometría de flujo. La línea de puntos representa el promedio del valor de IFM para el control de isotipo. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. *** $p \leq 0,001$.

Los datos obtenidos indican claramente que los LiB1 son una población de células con características de células activadas que secretan espontáneamente Acs de tipo IgM y que expresan un factor de transcripción, que no solo le da a las células características de células secretantes de Acs sino que puede conferirles mayor supervivencia, ya que este factor también está involucrado en la resistencia a la muerte celular por apoptosis (Lin y col., 2007). Es conocido que el entrecruzamiento de Fc γ RIIb gatilla la apoptosis de LiB por la vía mitocondrial, y este proceso involucra la participación de proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2, como lo es Bim (Xiang y col., 2007). Por todo lo expuesto, la susceptibilidad a la apoptosis a través de Fc γ RIIb fue evaluada

estudiando la disrupción del potencial de la membrana mitocondrial haciendo una tinción con el colorante catiónico TMRE, el cual es retenido en las mitocondrias de aquellas células vivas que conservan intacto el potencial de membrana mitocondrial. La Figura 5A muestra que el entrecruzamiento de FcgammaRIIb, disparada por incubación con un Ac contra el receptor mencionado, indujo la apoptosis tanto en LiB2 esplénicos como en LiB1 peritoneales. Sin embargo, los LiB1 peritoneales fueron más susceptibles, que los LiB2, a la muerte mediada por el entrecruzamiento de este receptor.

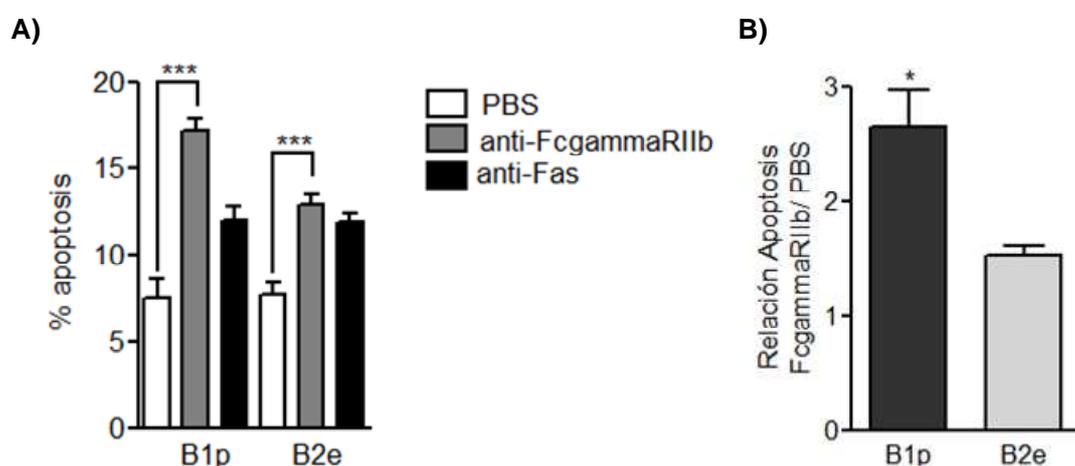


Figura 5: Apoptosis inducida por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb o de Fas en LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos.

A) Porcentaje de apoptosis (baja retención de TMRE), evaluada por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales (B1p) y LiB2 esplénicos (B2e) que fueron cultivados con (PBS, barras blancas) o con anticuerpo 2.4G2 (anti-FcgammaRIIb, barras grises) o con anti Fas soluble (barras negras). **B)** Relación entre apoptosis inducida por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb y apoptosis basal (PBS) en LiB1 peritoneales (B1p, barra negra) y LiB2 esplénicos (B2e, barra gris). Los resultados presentes en A-B son representativos de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$.

La Figura 5B muestra la relación entre la apoptosis inducida por el entrecruzamiento de Fc γ R2b y la apoptosis basal (incubación de las células en ausencia de anticuerpo) en los LiB1 peritoneales y en los LiB2 esplénicos. En concordancia con la incrementada susceptibilidad de los LiB1 peritoneales a la muerte mediada por Fc γ R2b, por western blot determinamos que estas células presentaron mayores niveles de la proteína pro-apoptótica Bim en comparación con los LiB2 esplénicos (Figura 6).

Al comparar la susceptibilidad a la apoptosis inducida por la vía Fas/FasL, utilizando un Ac anti Fas, observamos que los LiB2 esplénicos y los LiB1 peritoneales presentaron similares porcentajes de células cuyas mitocondrias pierden la capacidad de retener al TMRE. Los resultados indican que ambas poblaciones celulares tienen una susceptibilidad similar a la apoptosis con anti-Fas (Figura 5A).

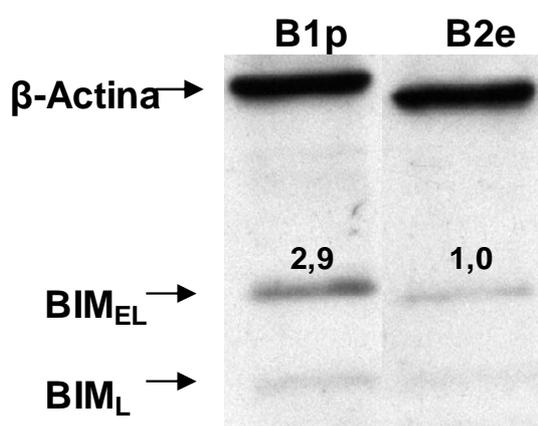


Figura 6: Expresión de BIM en LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos.

Perfil de expresión para la proteína pro-apoptótica BIM determinada por western blot en LiB1 peritoneales (pB1) y LiB2 esplénicos (eB2). La intensidad de cada banda se estimó por densitometría y los valores indicados con números en la figura sobre la banda proteica provienen de la normalización de cada banda con el control de carga, la proteína β -actina.

Conclusiones Resultados I

En esta primera parte de la tesis determinamos que:

- Los LiB1 expresaron los mayores niveles de FcγRIIb. Los altos niveles de expresión de FcγRIIb se asociaron con un fenotipo de células activadas (altos niveles de expresión de MHC clase II, CD80 y PDL-2) así como de células que poseen una activa maquinaria de síntesis de Acs (mayor frecuencia de células productoras de IgM, alto porcentaje de células con expresión intracelular de IgM^{high} y altos niveles de expresión de Blimp-1).
- Los LiB1 fueron más susceptibles a la muerte mediada por el entrecruzamiento de FcγRIIb, pero igualmente susceptibles a la muerte mediada por Fas, que los LiB2 esplénicos.

Los hallazgos obtenidos a través de la realización de experimentos *in vitro* nos llevaron a hipotetizar que el receptor FcγRIIb podría tener un rol fundamental en el mantenimiento de la supervivencia de los LiB1 *in vivo*.

Resultados II

Objetivo Específico

Analizar la participación de FcγRIIb en el control de la supervivencia de Linfocitos B1 in vivo.

Con el fin de analizar la participación de FcγRIIb en la sobrevivencia de los LiB1 peritoneales *in vivo*, uno de los primeros estudios que nos propusimos realizar fue determinar el número de LiB1 peritoneales y de las otras subpoblaciones de LiB en ratones que son deficientes en la expresión de dicho receptor. Para ello, células de cavidad peritoneal y de bazo de ratones salvajes y FcγRIIb^{-/-} fueron obtenidas y contadas en cámara de Neubauer, para luego ser teñidas con distintos Acs marcados con fluorocromos, utilizados para diferenciar las subpoblaciones de LiB. Finalmente, las células fueron analizadas por citometría de flujo. Para desarrollar este objetivo, contamos con la colaboración del Dr. Alexis Kalergis de la Pontificia Universidad Católica de Chile, el cual disponía de los animales FcγRIIb^{-/-} en su laboratorio. Se observó que los animales deficientes en FcγRIIb mostraron un incremento significativo en el número de LiB1 de cavidad peritoneal, comparados con el número de LiB1 peritoneales presentes en animales salvajes. El déficit de FcγRIIb no afectó numéricamente a las otras subpoblaciones de LiB (Figura 7A). Luego del hallazgo del incrementado número de LiB1 peritoneales en los ratones FcγRIIb^{-/-}, surgió la inquietud de evaluar los niveles de Acs naturales séricos en estos ratones ya que los LiB1 peritoneales son la fuente principal de los mismos (Baumgarth, 2011). Como puede observarse en la Figura 7B, los ratones FcγRIIb^{-/-} presentaron títulos séricos significativamente mayores de Acs naturales de isotipo IgM e IgG reactivos contra Fosfatidilcolina, los cuales fueron determinados por ELISA. Estos resultados concuerdan con lo expuesto en la literatura, ya que los LiB1 son los principales productores de Acs naturales reactivos no solo contra Fosfatidilcolina sino también contra otras moléculas conservadas presentes en distintos microorganismos (Ehrenstein y Notley, 2010).

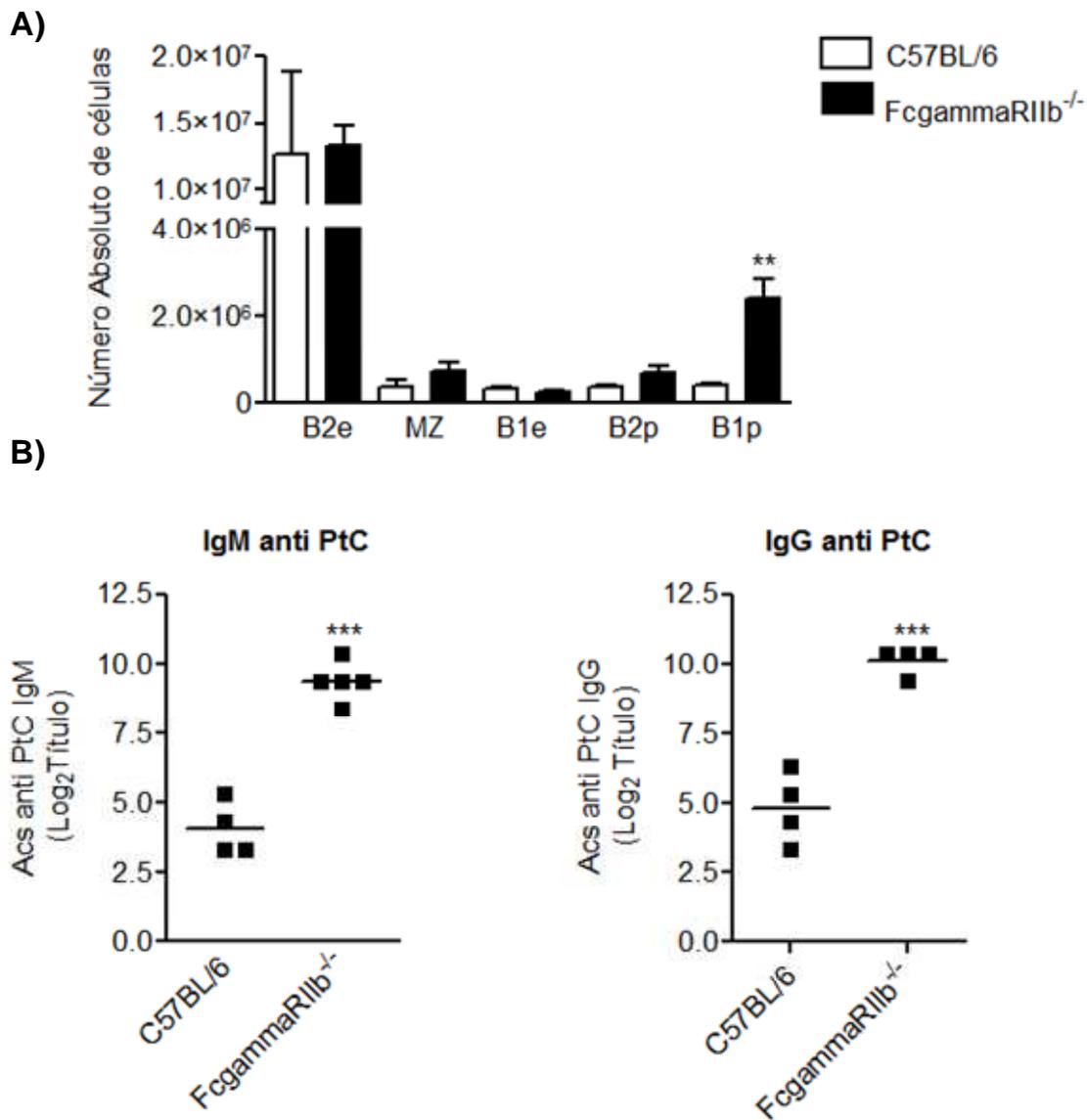


Figura 7: Subpoblaciones de LiB y títulos de Acs naturales en animales FcgammaRIIb^{-/-}

A) Número absoluto de LiB1 y LiB2 peritoneales (B1p y B2p) y LiB esplénicos (B2e, B1e, ZM) de ratones deficientes en FcgammaRIIb (barras negras) y animales salvajes (C57BL/6, barras blancas) **B)** Título de Acs séricos específicos contra fosfatidilcolina en ratones FcgammaRIIb^{-/-} y C57BL/6. Cada cuadrado representa el resultado obtenido de un animal. La línea representa el valor medio en cada grupo analizado. **p≤0,01; ***p≤0,001.

Algunas de las características fenotípicas y funcionales que poseen los LiB1 reflejan el estado de activación de estas células, y su capacidad de auto-renovación (Baumgarth, 2011; O'Garra y col., 1992). Dentro de las características intrínsecas de los LiB1, relacionadas a su capacidad de proliferación, podemos mencionar la activación de Erk y de Stat-3, que son constitutivas o sea están presentes en condiciones de reposo (Holodick y col., 2009b; Karras y col., 1997). Por lo tanto para determinar si diferencias en la expresión de éstas proteínas justificaban el mayor número de LiB1 en los ratones KO, decidimos evaluar los niveles de fosforilación de Stat-3 y Erk en LiB1 provenientes de animales salvajes y *FcgammaRIIb*^{-/-}. En la figura 8A y B se muestran histogramas representativos de la expresión de p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) y p-Stat3 (Tyr705) en LiB1 de animales salvajes (líneas negras) y de animales *FcgammaRIIb*^{-/-} (líneas grises). Niveles de expresión de ambas proteínas fosforiladas similares encontramos en LiB1 salvajes y *FcgammaRIIb*^{-/-}. Los resultados indican que el mayor número de LiB1 presente en la cavidad peritoneal de animales *FcgammaRIIb*^{-/-} no estaría asociado a un mayor grado de fosforilación de Erk y Stat3. Considerando que los LiB1 peritoneales expresaron mayores niveles de la proteína pro.apoptótica Bim que los LiB esplénicos, y que la apoptosis gatillada por el entrecruzamiento de *FcgammaRIIb* involucra la participación de esta proteína, evaluamos los niveles de expresión de Bim en LiB1 de animales salvajes y *FcgammaRIIb*^{-/-}. En la Figura 8C, se muestra un histograma representativo de la expresión de Bim en animales salvajes (líneas negras) y en animales *FcgammaRIIb*^{-/-} (líneas grises). No se encontraron diferencias en la expresión de Bim entre LiB1 salvajes y *FcgammaRIIb*^{-/-}, demostrando que el mayor número de LiB1 en animales *FcgammaRIIb*^{-/-} tampoco estaría asociado a una menor expresión de Bim en estas células.

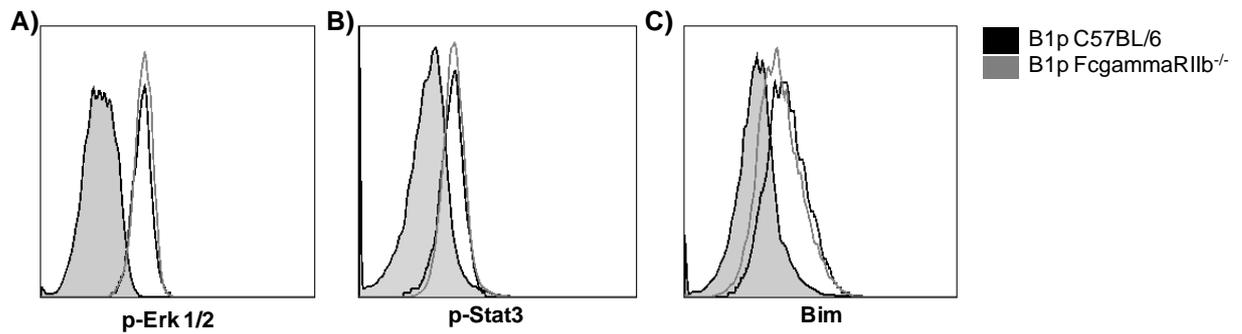


Figura 8: Expresión de p-Stat3, p-Erk y Bim en LiB1 salvajes y $Fc\gamma RIIb^{-/-}$.

Expresión ex vivo de **A)** p-Erk, **B)** p-Stat3 y **C)** Bim en LiB1 peritoneales de ratones salvajes (C57BL/6 líneas negras) y de ratones $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ (líneas grises). El histograma lleno gris muestra el control de isotipo, para cada una de las proteínas analizadas.

Una causa posible del incremento en el número de LiB1 peritoneales en animales $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ podría ser que los LiB1 de cavidad peritoneal de animales $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ presenten un mayor índice de proliferación celular. Para evaluar si este fenómeno estaba ocurriendo *in vivo*, ratones $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ y salvajes fueron hidratados con agua de bebida conteniendo Bromodeoxi-Uridina (BrdU) durante 5 días. Luego, por citometría de flujo, se evaluó el porcentaje de LiB1 peritoneales que incorporaron BrdU a su ADN. En la Figura 9A, se graficó el porcentaje de LiB1 que incorporaron BrdU ($BrdU^{+}$) en ratones $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ y salvajes. Este resultado evidencia que los porcentajes de LiB1 $BrdU^{+}$ fueron similares entre animales $Fc\gamma RIIb^{-/-}$ y salvajes, por lo tanto se excluye al incremento en la capacidad proliferativa como causa del mayor número de LiB1 peritoneales en animales $Fc\gamma RIIb^{-/-}$.

Otra alternativa al fenómeno observado podría ser que la pérdida de FcgammaRIIb de la superficie celular evite la muerte, y por lo tanto prolongue la sobrevivencia de los LiB1 peritoneales, generando así un incremento en el número absoluto de los mismos. Para evaluar esta posibilidad, LiB1 de cavidad peritoneal de ratones FcgammaRIIb^{-/-} y salvajes fueron purificados por "cell sorting". Luego, por citometría de flujo a través de la tinción con el colorante TMRE se evaluó *in vitro* la muerte espontánea de los mismos. En la Figura 9B se muestra el porcentaje de muerte espontánea de LiB1 de los ratones FcgammaRIIb^{-/-} y salvajes. Como puede apreciarse, luego de 24 horas de cultivo, los LiB1 peritoneales de animales FcgammaRIIb^{-/-} presentaron un menor porcentaje de células apoptóticas en comparación con los LiB1 provenientes de animales salvajes.

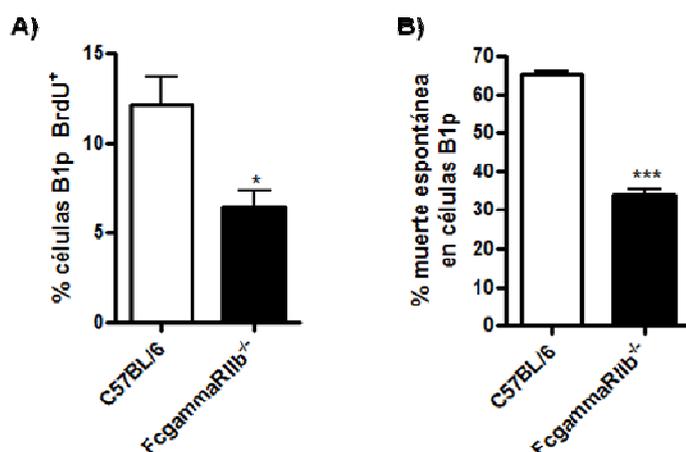


Figura 9: Capacidad proliferativa *in vivo* y muerte espontánea *in vitro* de LiB1 de ratones FcgammaRIIb^{-/-} y salvajes.

A) Porcentaje de LiB1 peritoneales (B1p) BrdU⁺ en ratones salvajes (C57BL/6, barras blancas) y FcgammaRIIb^{-/-} (barras negras) que fueron hidratados durante 5 días con agua de bebida conteniendo BrdU. **B)** Porcentaje de células apoptóticas, determinado por tinción con TMRE, en cultivos de LiB1 peritoneales (B1p) de animales salvajes (C57BL/6, barras blancas) y FcgammaRIIb^{-/-}, barras negras), incubados durante 24 hs sin ningún estímulo. *p≤0,05; ***p≤0,005.

Luego decidimos evaluar la sobrevida de LiB1 peritoneales de animales salvajes y FcgammaRIIb^{-/-} en vivo, para ello se diseñó un experimento de transferencia celular en el que LiB1 de animales salvajes y FcgammaRIIb^{-/-} fueron sorteados y coloreados con eFluor-670 o con CFSE respectivamente. Estas células fueron inyectadas en una mezcla (50%-50%) de LiB1 salvajes y LiB1 FcgammaRIIb^{-/-}, por vía intraperitoneal, en animales que carecen de LiB y LiT (SCID). Luego de 20 días de realizada la transferencia celular, los ratones SCID se sacrificaron y se evaluó el porcentaje de recuperación de LiB1 salvajes y FcgammaRIIb^{-/-}. En la Figura 10A puede observarse un gráfico de dos parámetros en el cual en el eje de las X se observa la expresión del fluorocromo efluor-670 (colorante con el que fueron marcados los LiB1 provenientes de animales salvajes) y en el eje de las Y se observa la expresión del colorante CFSE (colorante con el que fueron marcados los LiB1 provenientes de animales FcgammaRIIb^{-/-}). En este gráfico y en los gráficos de la Figura 10B y C se muestra que ambas poblaciones celulares presentaron similares rondas proliferación. En la Figura 10D observamos que el porcentaje de recuperación de LiB1 FcgammaRIIb^{-/-} fue mayor comparado con el porcentaje de recuperación de LiB1 salvajes. Con estos resultados se puede afirmar que el hallazgo de un mayor número de LiB1 peritoneales en animales FcgammaRIIb^{-/-} concuerda con una mayor sobrevida *in vitro* e *in vivo* de estas células y por lo tanto conduce a la acumulación de las mismas en la cavidad peritoneal de animales FcgammaRIIb^{-/-}.

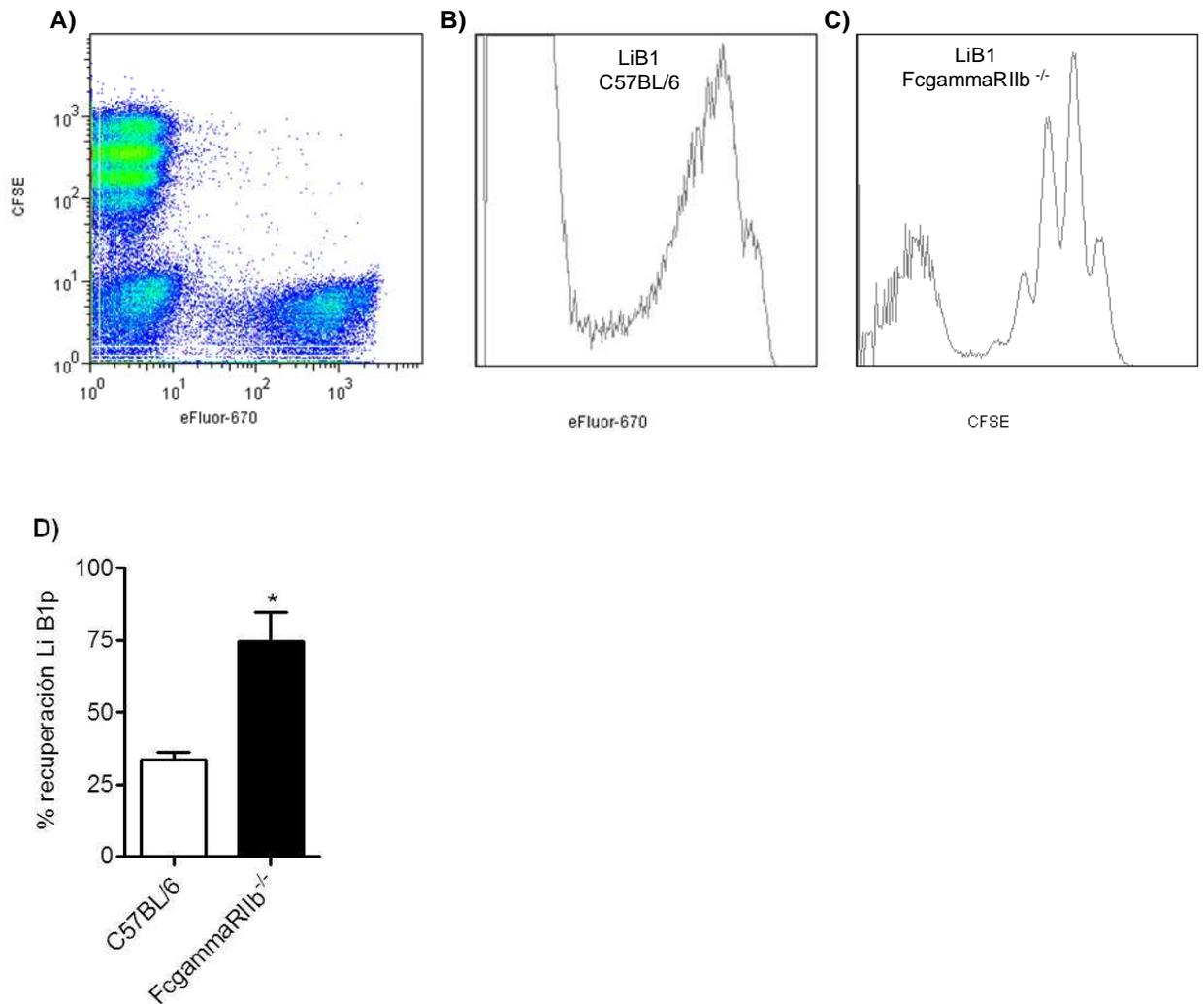


Figura 10: Sobrevida *in vivo* de LiB1 salvajes y FcγRIIb^{-/-}

Ratones NOD-SCID fueron inyectados con iguales cantidades de LiB1 salvajes (eFluor-670) y LiB1 FcγRIIb^{-/-} (CFSE). Luego de 20 días se evaluaron por citometría de flujo las células de cavidad peritoneal. **A)** Gráfico de 2 parámetros, en el eje de las X observamos a LiB1 salvajes y en el eje de las Y LiB1 FcγRIIb^{-/-}. **B y C)** Histogramas representativos en donde se evalúa las rondas de proliferación de LiB1 salvajes (B) y LiB1 FcγRIIb^{-/-} (C). **D)** Porcentaje de recuperación de LiB1 salvajes (barra blanca) y LiB1 FcγRIIb^{-/-} (barra negra). *p<0,05.

Conclusiones Resultados II

Nuestros resultados demuestran que:

- Ratones deficientes en FcgammaRIIb presentaron un elevado número de LiB1 peritoneales.
- Los niveles de expresión de p-Erk, p-Stat3 y Bim fueron similares entre LiB1 de animales salvajes y LiB1 de animales FcgammaRIIb^{-/-}, descartando la posibilidad de que estas proteínas estén involucradas en la mayor sobrevida de los LiB1 de animales FcgammaRIIb^{-/-}.
- La mayor capacidad proliferativa *in vivo* de los LiB1 de ratones FcgammaRIIb^{-/-} no es la causa del elevado número de estas células en dichos animales.
- La deficiencia de FcgammaRIIb^{-/-} hace que los LiB1 peritoneales tengan una mayor sobrevida *in vitro* e *in vivo*.

Con los datos obtenidos podemos concluir que el hecho de que los ratones FcgammaRIIb^{-/-} presenten incrementada la población de de LiB1 peritoneales está íntimamente relacionado al déficit de FcgammaRIIb, lo que conlleva a una mayor sobrevida de estas células *in vitro*.

Resultados III

Objetivo Específico

Identificar estímulos capaces de modificar la expresión de FcγRIIb y consecuentemente la susceptibilidad de los linfocitos B1 a la apoptosis mediada por éste receptor.

Es conocido que los LiB1 tienen una participación importante en etapas tempranas de la respuesta inmune montada contra bacterias, virus y ciertos parásitos. (Alugupalli y col., 2004; Benedict y Kearney, 1999; Boes y col., 1998; Choi y Baumgarth, 2008; Haas y col., 2005; Martin y col., 2001; Ochsenbein y col., 1999). Distintos estímulos, ya sean provistos por agentes infecciosos como ligandos de TLR o estímulos generados en una respuesta inmune contra infecciones como citoquinas, pueden activar a los LiB1 induciendo su diferenciación a células secretantes de Acs (Baumgarth, 2011). Por ello decidimos evaluar la capacidad de distintos estímulos, que simulan señales generadas durante una infección, de influir en el perfil de expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales. En la Figura 11A se muestra que IL4, una citoquina involucrada en la diferenciación de LiB a células con un fenotipo de memoria (Acosta Rodríguez y col., 2003), disminuye la expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales, tal como fue reportado para LiB2 esplénicos ((Rudge y col., 2002) y Figura 11B). Estímulos como LPS y CpG (ligandos de TLR-4 y TLR-9, respectivamente), pero no anti-CD40 (estímulo que simula la señalización de LiT activados vía CD40L), aumentaron la expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales luego de 48 horas de cultivo. Como puede observarse en la Figura 11B, estímulos como CpG y LPS también aumentaron la expresión de FcγRIIb en LiB2 esplénicos. Sin embargo, los niveles de expresión de FcγRIIb, en condiciones de activación, siempre fueron mayores en LiB1 peritoneales.

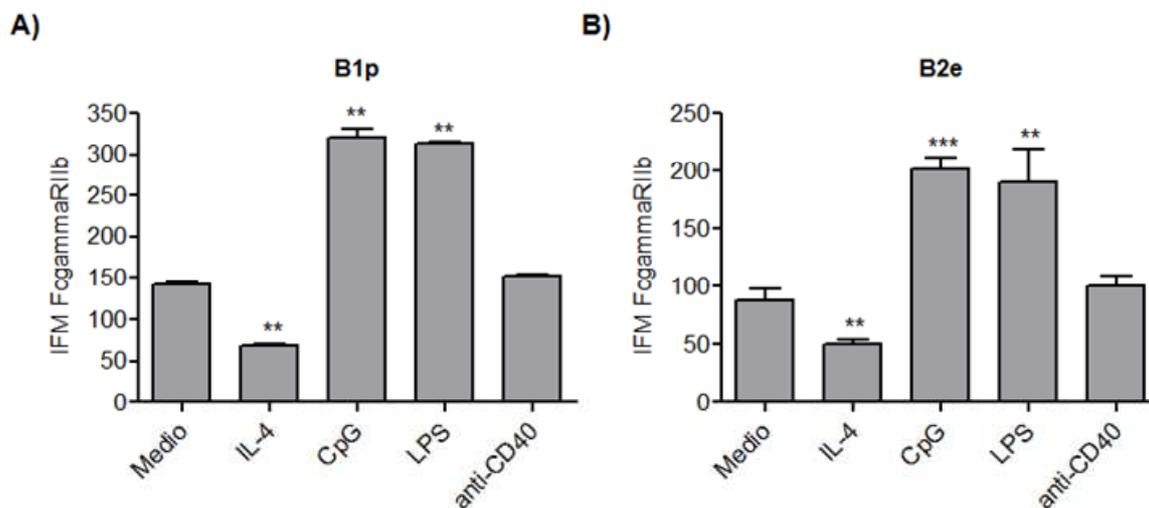


Figura 11: Expresión de FcγRIIb en LiB activados.

Intensidad de Fluorescencia media (IFM) \pm DS, evaluada por citometría de flujo, de la expresión de FcγRIIb en **A)** LiB1 peritoneales (B1p) y en **B)** LiB2 esplénicos (B2e) cultivados por 48 horas con medio, IL-4, CpG, LPS y anti-CD40. Los resultados presentes en A-B son representativos de 4 experimentos independientes. ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

Luego se evaluó la susceptibilidad de ambas subpoblaciones de LiB (LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos) activados a la muerte mediada por el entrecruzamiento de FcγRIIb. Para ello el porcentaje de células apoptóticas, luego de inducir la apoptosis con anti-FcγRIIb, se determinó a través de la tinción con TMRE por citometría de flujo. En la Figura 12A y 12B, se muestra que CpG, estímulo que incrementa la expresión de FcγRIIb en los LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos, también incrementa la susceptibilidad de estas células a la muerte a través de este receptor. Cabe destacar que los LiB1 peritoneales y los LiB2 esplénicos activados con CpG, fueron igualmente susceptibles a la apoptosis vía FcγRIIb, a pesar que los LiB1 peritoneales activados con CpG expresaron mayores niveles de FcγRIIb que los LiB2 esplénicos activados de la misma manera. (Figura 11 y 12).

Conforme al bajo nivel de expresión de FcγRIIb en los LiB1 peritoneales incubados con IL4 o con anti-CD40, los mismos fueron resistentes a la apoptosis inducida por el entrecruzamiento de éste receptor (Figura 12A).

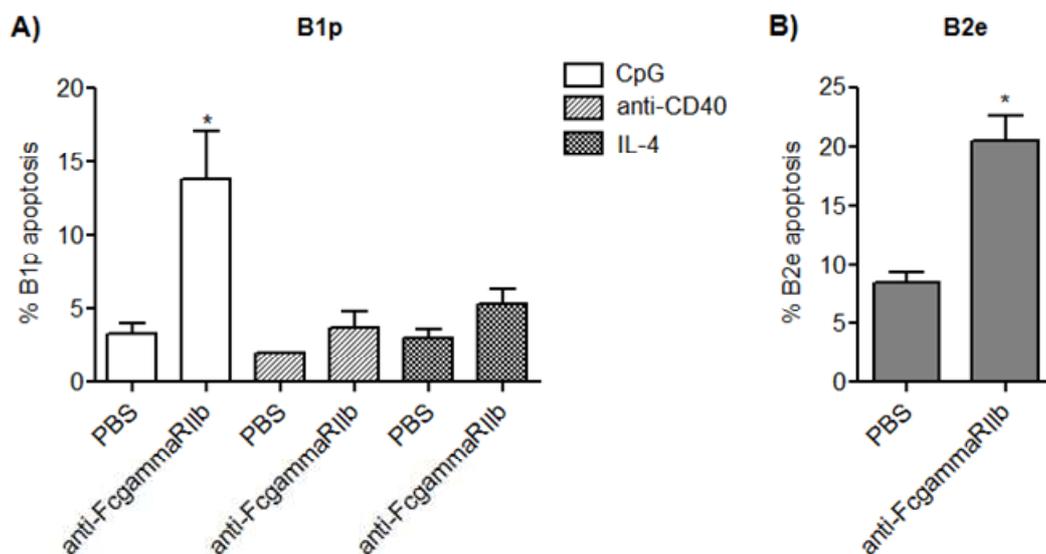


Figura 12: Apoptosis de LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos activados.

A) Porcentaje de apoptosis (baja retención de TMRE), evaluada por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales (B1p) cultivados con CpG (barras blancas), anti CD40 (barras rayadas) o IL-4 (barras cuadrículadas) durante 48 horas y luego cultivados 18 hs más sin anticuerpo (PBS) o con 2.4G2 (anti-FcγRIIb). **B)** Porcentaje de apoptosis en LiB2 esplénicos (B2e) cultivados con CpG y luego 18 hs más sin anticuerpo (PBS) o con 2.4G2 (anti-FcγRIIb). * $p \leq 0,05$.

En el año 2007, el grupo del Dr Ravetch reportó que la expresión de FcγRIIb se hallaba aumentada en células plasmáticas de médula ósea, y que el entrecruzamiento de este receptor inducía la apoptosis de estas células (ficha). Por lo tanto al hallar que los LiB1 peritoneales activados con ligandos de TRL, como CpG, aumentaban la expresión de FcγRIIb (Figura 11A), quisimos determinar si el fenotipo y la funcionalidad de estas células activadas se correlacionaba con el de células secretantes de Acs. Para ello LiB1

peritoneales obtenidos por "cell sorting" se cultivaron con CpG y luego de 48 horas de cultivo se evaluó el fenotipo y funcionalidad de las células activadas. El fenotipo se evaluó determinando la expresión de FcγRIIb y la expresión de CD138, comúnmente llamado Syndecan-1 y marcador típico de célula secretante de Acs. Los gráficos de dos parámetros de la Figura 13A muestran, como era de esperar, que los LiB1 peritoneales cultivados con CpG aumentaron la expresión de FcγRIIb con respecto a aquellos LiB1 cultivados en presencia de medio solamente. De manera interesante resultó el hallazgo de que dentro de la población de células con alta expresión de FcγRIIb un 55% de los LiB1 expresaron CD138 mientras que un 44% no lo hicieron.

Luego, la frecuencia de células productoras de Acs en estas dos poblaciones de LiB1 activados, FcγRIIb⁺⁺⁺ CD138⁻ y FcγRIIb⁺⁺⁺ CD138⁺, fue evaluada. Para ello, luego de cultivar a LiB1 peritoneales con o sin CpG durante 48 horas, se procedió a realizar una purificación por sorteo celular en la cual los LiB1 se separaron en base a la expresión de FcγRIIb y de CD138. En la Figura 13A se muestran las distintas poblaciones de células que fueron separadas. Los LiB1 cultivados con medio, que expresaron bajos niveles de FcγRIIb y fueron negativos para CD138, conformaron la población denominada I. Los LiB1 cultivados con CpG que expresaron altos niveles de FcγRIIb pero que no expresaron CD138, se los denominó población II. Finalmente la población de LiB1 activados con CpG que coexpresaron altos niveles de FcγRIIb y CD138, se las denominó población III. En la Figura 13B se muestra la frecuencia de células secretantes de Acs de isotipo IgM en las distintas poblaciones de LiB1 analizadas, destacándose que no existieron diferencias significativas en la frecuencia de células secretantes de Acs entre la población II y III. Además, en las distintas poblaciones sorteadas se evaluó, por citometría de flujo, la expresión de Blimp-1, factor de transcripción involucrado en el desarrollo de

células plasmáticas. En la Figura 13C se puede apreciar que la expresión de Blimp-1 fue mayor en la población III comparándose con la población II. Cabe destacar que en la población III, se observa una mayor tendencia a la producción de Acs, sin ser la misma estadísticamente significativa.

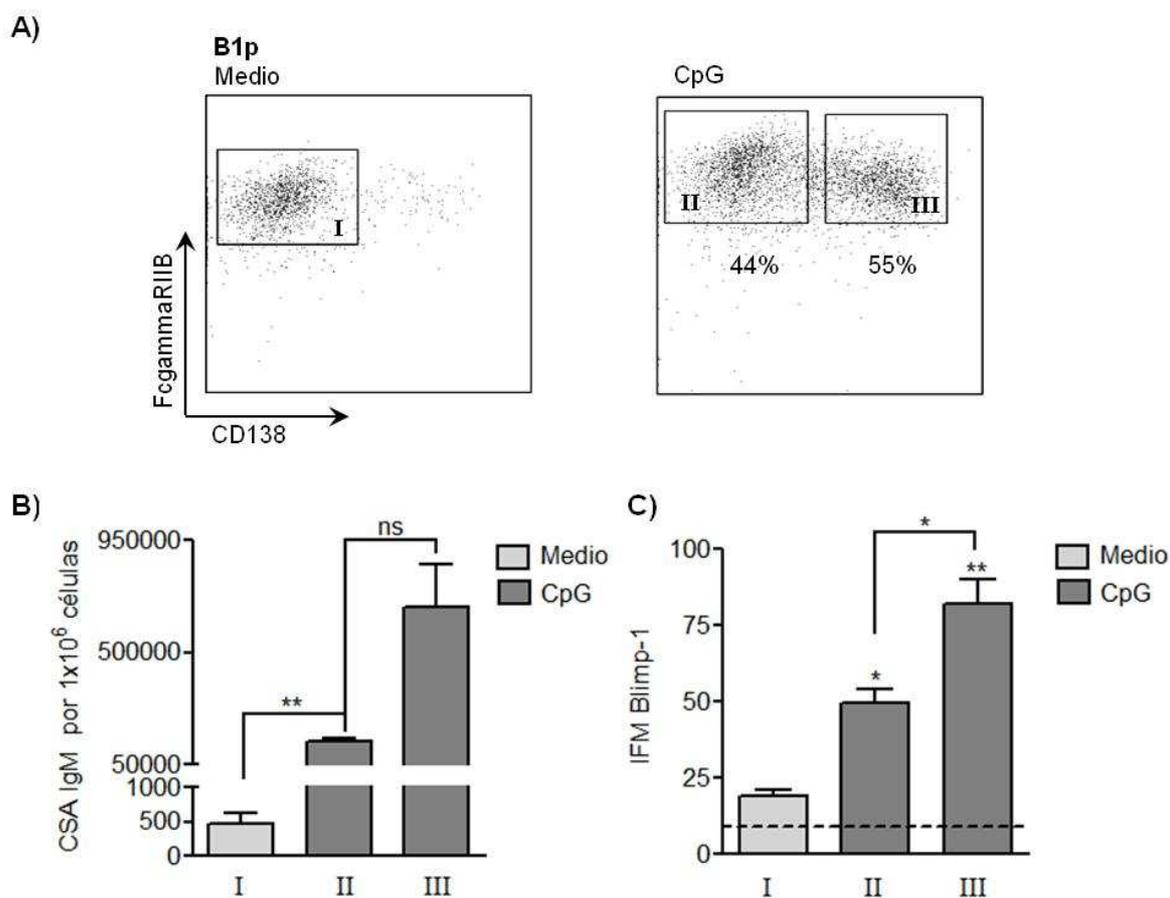


Figura 13: Fenotipo y funcionalidad de LiB1 peritoneales activados con CpG

A) Expresión de CD138 y FcγRIIb en LiB1 peritoneales, incubados durante 48 hs con medio solo o con CpG. **B)** Frecuencia de células secretantes de Acs (CSA) de isotipo IgM y **C)** Expresión de Blimp-1 determinadas en las distintas poblaciones delimitadas en **A**. Población I: LiB1 no estimulados FcγRIIb⁺, Población II: LiB1 estimulados con CpG FcγRIIb⁺⁺⁺CD138⁺, Población III: LiB1 estimulados con CpG FcγRIIb⁺⁺⁺CD138⁺. *p < 0,05; **p < 0,005. ns: no significativa.

Podríamos entonces especular que la población III se encuentra más diferenciada hacia un perfil de célula plasmática, y que la población II sería un estadio previo al III, en el cual las células comienzan a adquirir la funcionalidad y el fenotipo de células secretantes de Acs. Por lo tanto podemos concluir que la población de LiB1 activados con CpG, los cuales expresaron altos niveles de FcγRIIb, presentaron no solo el fenotipo sino también la funcionalidad de células productoras de Acs, como expresión de Blimp-1⁺ y producción de IgM, con o sin expresión de CD138, postulando a la alta expresión de FcγRIIb como marcador de células secretante de Acs.

Conclusiones resultados III

Podemos concluir que:

- Estímulos como ligandos de TLR (CpG y LPS) producen un aumento en la expresión de FcgammaRIIb, no solo en LiB1 peritoneales, sino también en LiB2 esplénicos. Los niveles de expresión de FcgammaRIIb fueron siempre mayores en LiB1 peritoneales activados. Ambas poblaciones de LiB activados con CpG fueron igualmente susceptibles a la muerte inducida por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb.
- Estímulos que llevan a los LiB a diferenciarse en LiB de memoria, como lo son IL-4 y anti-CD40, no conducen a un aumento en la expresión de este receptor ni en LiB1 peritoneales ni en LiB2 esplénicos. Más aún el agregado de IL-4 indujo una disminución en la expresión de FcgammaRIIb en LiB1 peritoneales y en LiB2 esplénicos. Los LiB1 peritoneales activados con IL-4 o con anti CD40 fueron resistentes a la apoptosis mediada por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb.
- Finalmente, postulamos a la alta expresión de FcgammaRIIb como un nuevo marcador/indicador de células secretantes de Acs, ya que las poblaciones con alta expresión del receptor presentaron altos niveles de expresión de Blimp-1 y una alta frecuencia de células productoras de IgM.

Resultados IV

Objetivo Específico

Evaluar la participación de BAFF en el control de la supervivencia de Linfocitos B1 mediada por FcγRIIb.

En los últimos años se reportó la existencia de un factor soluble denominado BAFF (B cell activating factor) el cual es esencial para el desarrollo de LiB maduros y consecuentemente para una adecuada respuesta de Acs (Batten y col., 2000). Así, ratones de la cepa A/WySnJ los cuales presentan una alterada señalización a través de uno de los receptores para BAFF (BAFF-R) exhiben un bloqueo en el desarrollo de la progenie B y presentan una marcada linfopenia de LiB2 esplénicos y de zona marginal (Yan y col., 2001). Sin embargo aunque BAFF no afecta el desarrollo de los LiB1 es capaz de actuar como co-estimulo, junto a ligandos de TLR, favoreciendo la proliferación y secreción de citoquinas por parte de los LiB1 peritoneales (Ng y col., 2006). Basados en éstos antecedentes decidimos evaluar el efecto de BAFF en la expresión de FcgammaRIIb sobre los LiB1 peritoneales activados con CpG. La Figura 14A muestra que BAFF redujo la expresión de FcgammaRIIb, determinada por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales activados con CpG. El solo agregado de BAFF al cultivo de LiB1 peritoneales no indujo cambios en la expresión de FcgammaRIIb. La disminución en la expresión de FcgammaRIIb que produjo el agregado de BAFF a LiB1 activados con CpG, se observó no solo a nivel de proteína (a través de la metodología de citometría de flujo) sino también a nivel de ARNm, ya que por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Figura 14B) se observó una disminución significativa en los transcritos de ARNm para FcgammaRIIb cuando las células activadas son cultivadas con BAFF. Es importante resaltar que el estímulo CpG+BAFF no indujo cambios en la expresión de FcgammaRIIb en LiB2 esplénicos (Figura 14C).

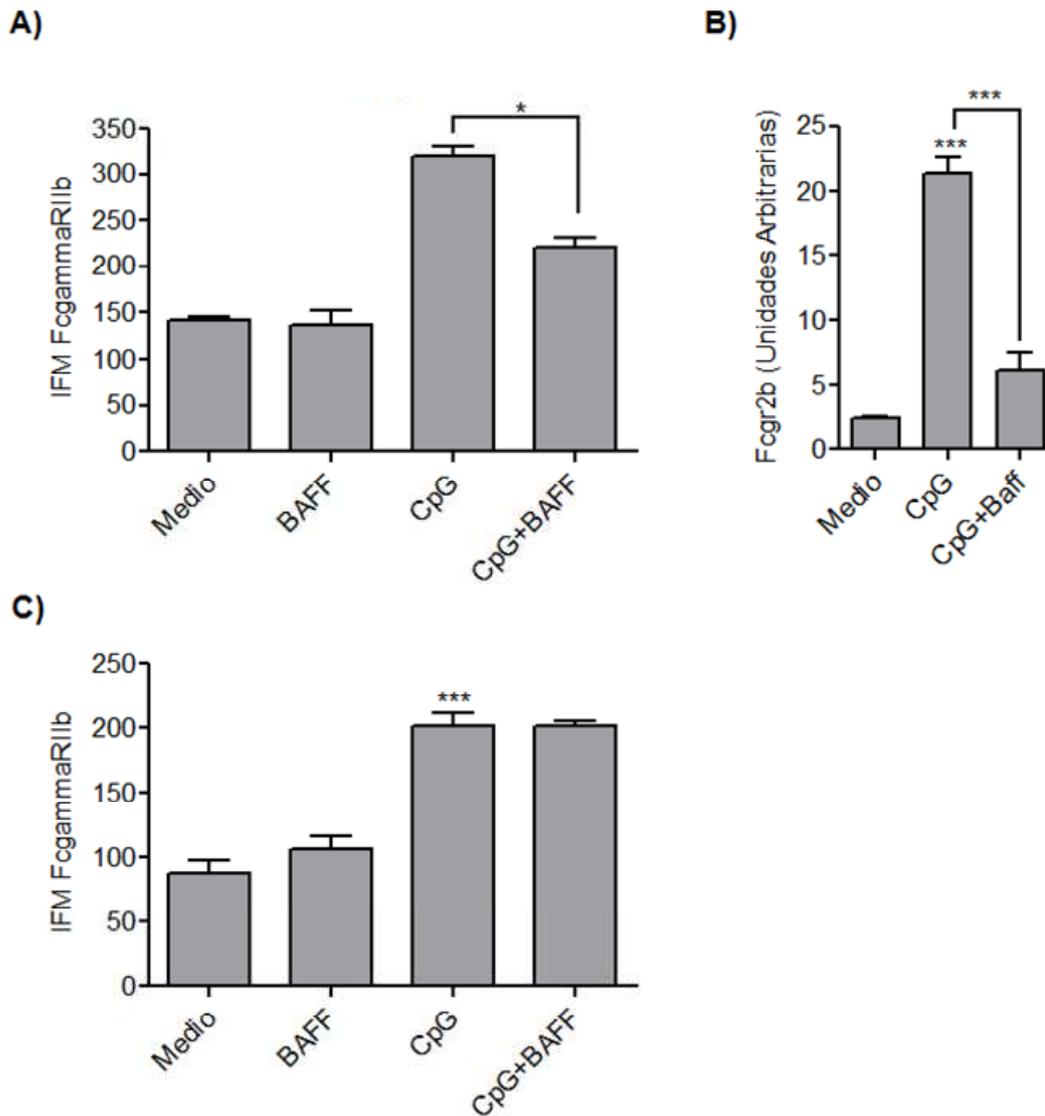


Figura 14: Expresión de FcgammaRIIb en LiB activados cultivados en presencia de BAFF.

A) Intensidad de Fluorescencia media (IFM) \pm DS de la expresión de FcgammaRIIb en LiB1 peritoneales cultivados 48 horas con medio, BAFF, CpG y CpG+BAFF, evaluada por citometría de flujo. **B)** Niveles de ARNm de fcgr2b, en LiB1 peritoneales cultivados con medio, CpG o CpG+BAFF durante 40 horas, evaluado por PCR en tiempo real. La determinación de HPRT se realizó para controlar la calidad y cantidad de los transcritos. **C)** Intensidad de Fluorescencia media (IFM) \pm DS de la expresión de FcgammaRIIb, evaluada por citometría de flujo, en LiB2 esplénicos cultivados 48 horas con medio, BAFF, CpG y CpG+BAFF. Los resultados presentes en A-C son representativos de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Los efectos de BAFF pueden ser el resultado de un delicado equilibrio de señales transmitidas a través de sus tres receptores. Dentro de los receptores para BAFF encontramos a BAFF-R (BAFF receptor), TACI (Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor) y BCMA (B Cell Maturation protein A), los cuales son expresados en distintos tipos celulares entre ellos los LiB. Cabe destacar que BAFF-R es el único receptor que tiene como único ligando a BAFF (Thompson JS y col), mientras que BCMA y TACI también unen a otra citoquina de la familia TNF conocida como APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) (Shulga-Morskaya y col., 2004).

El hecho de que BAFF actúe a través de distintos receptores nos llevó a pensar que la regulación diferencial de BAFF sobre la expresión de FcγRIIb en los LiB1 activados con CpG podría estar íntimamente relacionado con el perfil de expresión de los receptores BAFF-R, TACI y BCMA en los LiB1 peritoneales. En la Figura 15 se muestran histogramas de expresión para BAFF-R, TACI y BCMA en LiB1 peritoneales, LiB2 peritoneales y LiB2 esplénicos. Los números observados en cada histograma representan los valores de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) para BAFF-R y TACI, y en el caso de BCMA, se muestran los porcentajes de células que expresaron este receptor. Todas las subpoblaciones de LiB expresaron BAFF-R y TACI. Como puede apreciarse, no hubo diferencias significativas en el perfil de expresión *ex vivo* de BAFF-R entre las distintas subpoblaciones de LiB. Sin embargo, los LiB1 peritoneales obtenidos *ex vivo* mostraron los mayores niveles de expresión de TACI (mayores valores de IFM) y un alto porcentaje de estas células expresaron el receptor BCMA. La expresión de todos los receptores de BAFF en LiB activados con CpG fue similar (datos no mostrados).

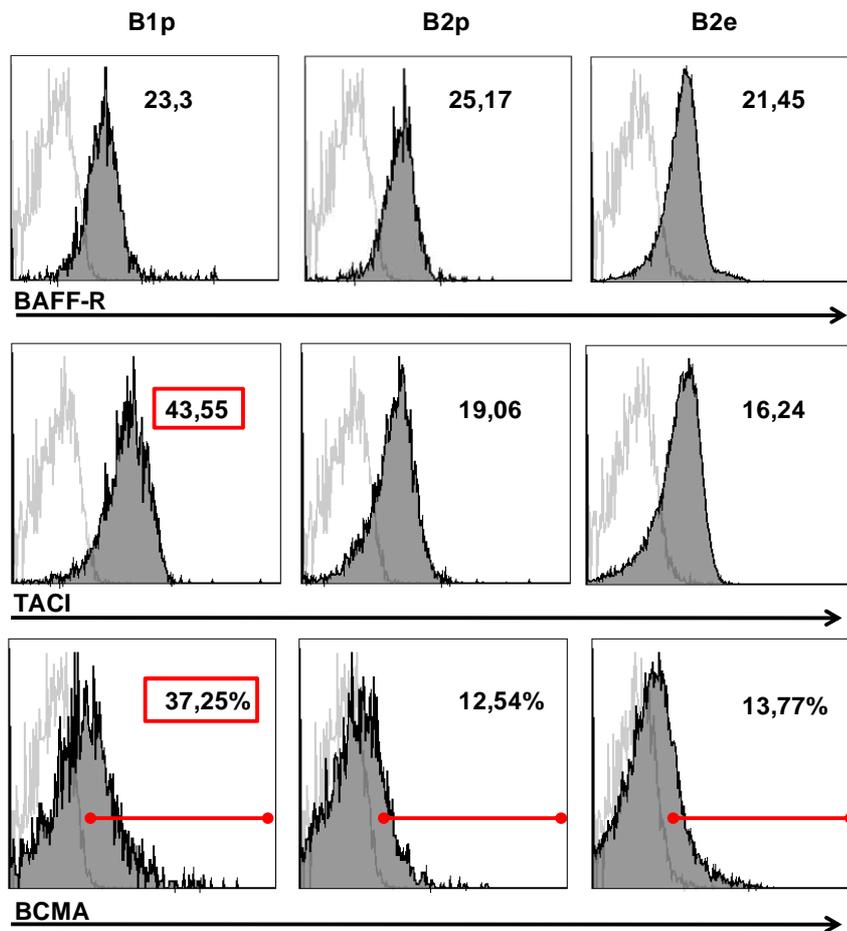


Figura 15: Expresión de receptores para BAFF en LiB.

Expresión *ex vivo* de BAFF-R, TACI y BCMA en LiB1 peritoneales (B1p), LiB2 peritoneales (B2p) y en LiB2 esplénicos (B2e), evaluadas por citometría de flujo. Los números en cada gráfico muestran el valor de Intensidad de Fluorescencia Media para BAFF-R y TACI, y los porcentajes de expresión de cada subpoblación para BCMA. Se muestran histogramas representativos de un grupo de 5 animales.

Para determinar si la disminución que BAFF produce en la expresión de FcγRIIb en LiB1 activados esta circunscripta solamente a este regulador negativo, la expresión de CD22 (regulador negativo de señales vía BCR) fue evaluada por citometría de flujo en LiB1 activados con CpG o con CpG+BAFF. En la Figura 16 puede observarse un

histograma representativo en el cual se observa que, como previamente fue reportado (Lajaunias y col., 2002), CpG disminuyó la expresión de CD22 en LiB1. El agregado de BAFF a los LiB1 activados con CpG no indujo cambios en la expresión de CD22. Podemos concluir que la disminución de FcγRIIb producida por BAFF se circunscribe a FcγRIIb y no a otros reguladores negativos como CD22.

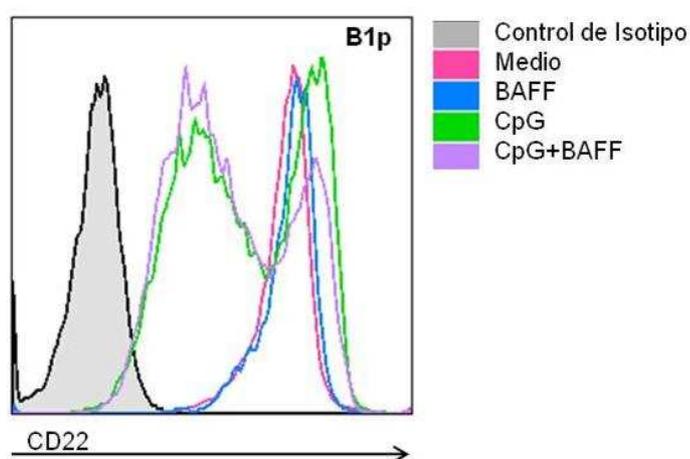


Figura 16: Expresión de CD22 en LiB1 activados cultivados en presencia de BAFF.

Expresión de CD22 en LiB1 peritoneales cultivados 48 horas con medio, BAFF, CpG y CpG+BAFF, evaluada por citometría de flujo.

Luego decidimos evaluar la susceptibilidad de LiB1 cultivados con CpG+BAFF a la apoptosis mediada por FcγRIIb. En la Figura 17 se muestran los porcentajes de células apoptóticas, evaluadas a través de la tinción con TMRE, de LiB1 peritoneales previamente activados con CpG o CpG+BAFF a los cuales luego de 48 horas de activación se les indujo o no el entrecruzamiento de FcγRIIb. De manera interesante resultó el hecho de que los porcentajes de apoptosis vía FcγRIIb en LiB1 peritoneales activados

con CpG en presencia de BAFF fueron similares a los porcentajes de apoptosis de estas células en ausencia de un estímulo inductor de apoptosis. Por lo tanto los porcentajes de apoptosis disparada a través de FcγRIIb en LiB1 activados con CpG+BAFF fueron significativamente menores que los porcentajes de apoptosis vía FcγRIIb en LiB1 activados solamente con CpG (Figura 17). Podemos concluir que los LiB1 peritoneales activados con CpG en presencia de BAFF se encontraron protegidos de la muerte vía FcγRIIb.

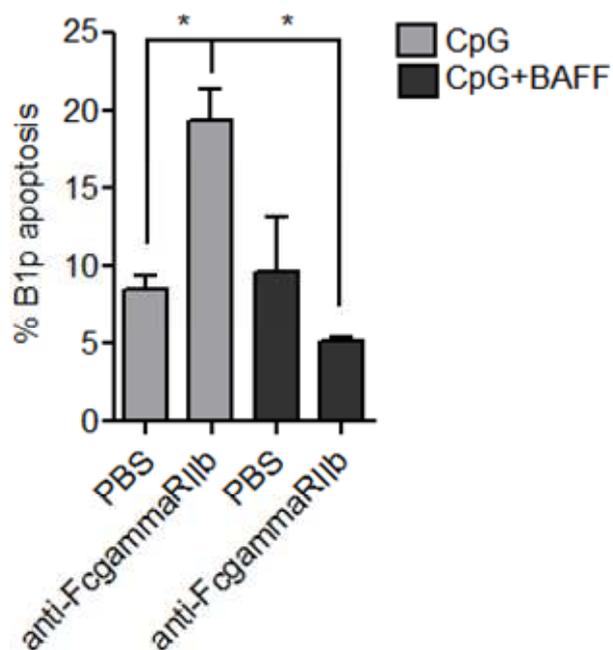


Figura 17: Apoptosis vía FcγRIIb de LiB1 peritoneales activados y cultivados en presencia de BAFF.

Porcentaje de apoptosis (baja retención de TMRE), evaluada por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales cultivados con CpG (barras grises) o con CpG+BAFF (barras negras) durante 48 horas y luego cultivados 18 hs más sin anticuerpo (PBS) o con 2.4G2 (anti-FcγRIIb). * $p \leq 0,05$.

Para evaluar si el efecto de BAFF estaba circunscripto a la apoptosis vía FcγRIIb o a la apoptosis vía otros receptores de muerte, se evaluó la acción de BAFF en la muerte, disparada por Fas, sobre LiB2 esplénicos activados con LPS. En la Figura 18A se muestra el porcentaje de células apoptóticas, determinado por citometría de flujo, en LiB2 esplénicos cultivados con LPS o con LPS+BAFF y que luego fueron incubados con PBS o con un anticuerpo que entrecruza Fas. Puede observarse que el agregado de BAFF a LiB2 esplénicos activados con LPS aumenta el porcentaje de células apoptóticas al producirse el entrecruzamiento de Fas. Como previamente habíamos demostrado a través de otras metodologías (Acosta-Rodriguez y col., 2007a), BAFF no protege, sino más bien promueve la apoptosis vía Fas/Fas-L en LiB2 esplénicos activados con LPS (Figura 18A). Debido a que demostramos que BAFF aumentaba la apoptosis vía Fas en LiB2 esplénicos activados con LPS a través del aumento en la expresión de Fas, decidimos analizar los niveles de expresión de Fas sobre nuestras células de estudio. En la Figura 18B se muestra la expresión de Fas, evaluada por citometría de flujo, en LiB2 esplénicos cultivados con medio, LPS o LPS+BAFF. En concordancia con resultados previos, se observa que BAFF aumentó la expresión de Fas en LiB2 esplénicos activados con LPS. Este resultado indica que el efecto anti-apoptótico que ejerce BAFF al proteger de la apoptosis vía FcγRIIb a LiB1 activados disminuyendo la expresión de este receptor, es un evento circunscripto a la muerte mediada por el entrecruzamiento de FcγRIIb y no al entrecruzamiento de otros receptores de muerte como Fas.

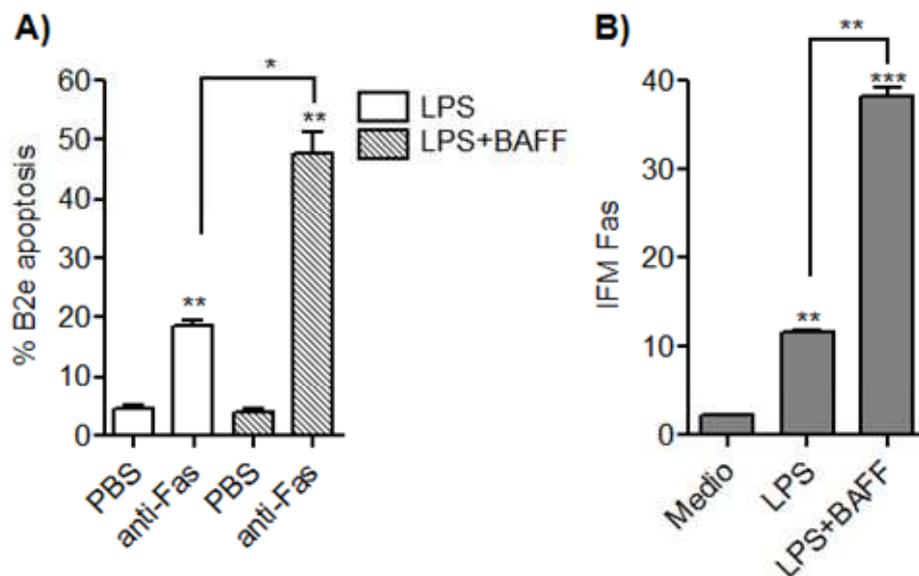


Figura 18: Apoptosis vía Fas y expresión de Fas en LiB2 esplénicos activados en presencia de BAFF.

A) Porcentaje de apoptosis (baja retención de TMRE), evaluada por citometría de flujo, en LiB2 esplénicos cultivados con LPS (barras lisas) o con LPS+BAFF (barras rayadas) durante 48 horas y luego cultivados 18 hs más sin anticuerpo (PBS) o con anti-Fas (Jo-2). **B)** Expresión de Fas, evaluada por citometría de flujo, en LiB2 esplénicos cultivados con medio, LPS o LPS+BAFF durante 48 horas. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

El hecho de que excesos sistémicos de la citoquina BAFF estén asociados a enfermedades autoinmunes en donde los LiB tienen un rol patognomónico (Mackay y col., 1999) y los hallazgos obtenidos en nuestro laboratorio acerca de que BAFF protege a los LiB1 activados de la muerte mediada por el entrecruzamiento de Fc γ RIIb (Figura 17), nos llevaron a evaluar si niveles elevados de BAFF *in vivo*, pueden afectar la expresión de Fc γ RIIb y la apoptosis vía este receptor de los LiB1 peritoneales. Este objetivo se pudo llevar a cabo gracias a la colaboración establecida con el laboratorio del Dr David Rawlings del Seattle Children's Research Institute, Washington State, EEUU, en el cual se encontraban disponibles los animales BAFF Transgénicos (BAFF-Tg). En la Figura 19A

se muestran los niveles de expresión de FcgammaRIIb, evaluados por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales de animales salvajes (C57BL/6) y de animales BAFF-Tg. Como puede apreciarse, los LiB1 peritoneales de animales BAFF-Tg presentaron niveles de expresión de FcgammaRIIb disminuidos comparados con los niveles de expresión de los LiB1 de animales salvajes. En contraste, en la Figura 19B se muestra, a través de histogramas, que no hubo diferencias en los niveles de expresión de FcgammaRIIb en las distintas subpoblaciones de LiB esplénicos (LiBT1, LiBT2, LiBZM y LiB2 o foliculares) de animales salvajes y BAFF-Tg.

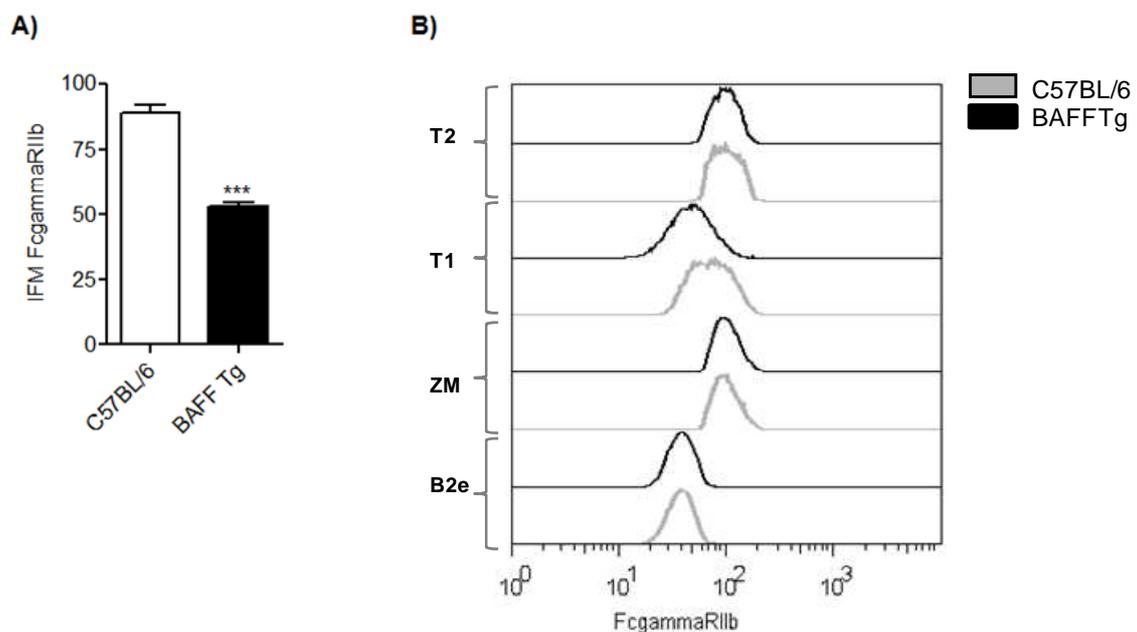


Figura 19: Expresión de FcgammaRIIb en LiB de animales BAFF-Tg.

A) Expresión de FcgammaRIIb, evaluada por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales de animales salvajes (C57BL/6, barra blanca) y de animales BAFF-Tg (barra negra). **B)** Expresión de FcgammaRIIb, evaluada por citometría de flujo, en distintas subpoblaciones de LiB de bazo (T2, T1, MZ, y foliculares o B2e) en animales salvajes (C57BL/6, histogramas de líneas grises) y animales BAFF-Tg (histogramas de líneas negras). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes entre sí. ***p<0,001.

Posteriormente, la susceptibilidad a la apoptosis, mediada por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb, fue evaluada en LiB1 peritoneales provenientes de animales salvajes y de animales BAFF-Tg. A través de la tinción con TMRE, en la Figura 20A, se muestra que los LiB1 de animales BAFF-Tg, a los cuales se les indujo la apoptosis vía FcgammaRIIb, presentaron un porcentaje de células apoptóticas que es similar al porcentaje de apoptosis de estas células cultivadas con PBS. Ambos porcentajes fueron significativamente inferiores al porcentaje de células apoptóticas presentes en los LiB1 peritoneales de ratones salvajes que fueron incubados con el anticuerpo 2.4G2 (anti-FcgammaRIIb). Los resultados indican que los LiB1 de animales BAFF-Tg se encontraron protegidos de la muerte mediada por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb.

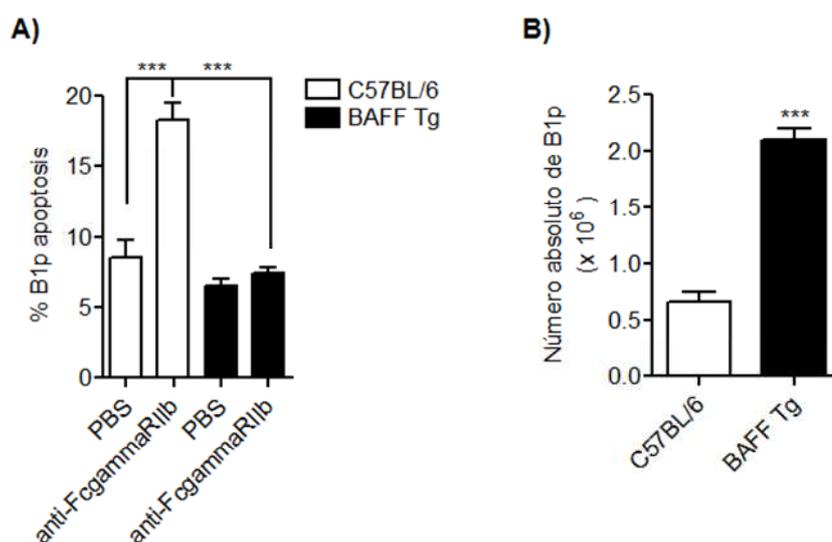


Figura 20: LiB1 peritoneales en animales BAFF-Tg: Apoptosis vía FcgammaRIIb y número absoluto

A) Porcentaje de apoptosis (baja retención de TMRE), evaluada por citometría de flujo, en LiB1 peritoneales de animales salvajes (C57BL/6, barras blancas) o animales BAFF-Tg (barras negras) cultivados durante 18 horas sin anticuerpo (PBS) o con 2.4G2 (anti-FcgammaRIIb). **B)** Número absoluto de LiB1 peritoneales de animales salvajes (barra blanca) y animales BAFF-Tg (barra negra). Los resultados mostrados en A-B son representativos de dos experimentos independientes entre sí. *** $p \leq 0,001$.

Como previamente fue reportado (Fletcher y col., 2011; Fletcher y col., 2006), observamos que los animales BAFF-Tg presentaron un número incrementado de LiB1 peritoneales (Figura 20B).

Finalmente, decidimos evaluar lo que acontecía *in vivo* frente a una situación de activación de los LiB1 peritoneales de animales BAFF-Tg. Para ello ratones salvajes y ratones BAFF-Tg fueron inmunizados con 30 ug de CpG por vía intraperitoneal y, a las 72 horas de la inmunización, las células de cavidad peritoneal y los bazos de los ratones inmunizados fueron obtenidos. Luego, a través de citometría de flujo, se evaluó la expresión de FcgammaRIIb en las distintas subpoblaciones de LiB. Cabe señalar que ratones de ambas cepas inyectados con PBS fueron utilizados como controles. En la Figura 21 se muestra que la inmunización con CpG indujo un aumento en la expresión de FcgammaRIIb no solo en LiB1 peritoneales de ratones salvajes sino también en LiB1 de ratones BAFF-Tg. Sin embargo, los elevados niveles de BAFF *in vivo* hicieron que el aumento en la expresión de FcgammaRIIb se vea disminuido en los LiB1 de ratones BAFF-Tg inmunizados al compararlos con los de LiB1 de animales salvajes inmunizados. Por lo tanto podemos concluir que el efecto inhibitorio de BAFF sobre la expresión de FcgammaRIIb se mantuvo aún luego de inmunizar ratones BAFF-Tg con CpG. El efecto *in vivo* de BAFF sobre la expresión de FcgammaRIIb fue exclusivamente producido en LiB1 peritoneales, ya que no se observaron diferencias en la expresión de FcgammaRIIb en las poblaciones de LiB esplénicos de animales salvajes y BAFF-Tg inmunizados con CpG (datos no mostrados).

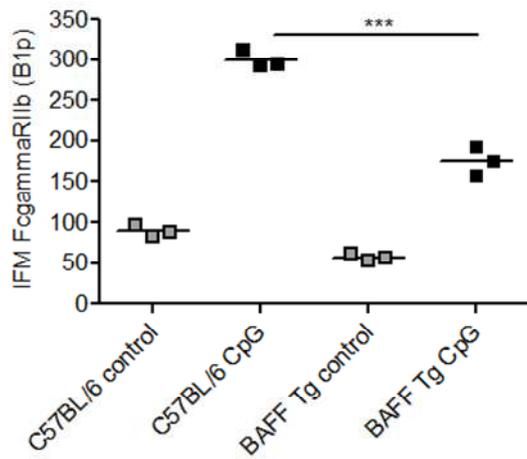


Figura 21: Expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales de animales inmunizados con CpG.

Expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales de animales salvajes (C57BL/6) o animales BAFF-Tg, a las 72 horas de ser inyectados con PBS (cuadrados grises, grupo control) o inmunizados por vía intraperitoneal con 30 ug de CpG (cuadrados negros). ***p<0,001.

Conclusiones Resultados IV

En esta última parte de esta tesis determinamos que:

- BAFF disminuye la expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales activados con CpG, no solo a nivel de la membrana celular, sino también a nivel de ARN mensajero de fcgr2b.
- Los LiB1 peritoneales expresaron mayores niveles de TACI y mayores porcentajes de expresión de BCMA que LiB2 peritoneales y esplénicos. Los niveles de expresión de BAFF-R fueron similares en LiB1 peritoneales, LiB2 peritoneales y LiB2 esplénicos.
- BAFF protegió a los LiB1 activados con CpG *in vitro* de la muerte mediada por el entrecruzamiento de FcγRIIb.
- Altos niveles de BAFF *in vivo* conducen a un elevado número de LiB1 peritoneales, los cuales expresan significativamente menores niveles de FcγRIIb en su superficie, y a la vez están protegidos de la muerte mediada por el entrecruzamiento de éste receptor.
- Finalmente, LiB1 de animales BAFF-Tg inmunizados con CpG por vía intraperitoneal, expresaron significativamente menores niveles de FcγRIIb que LiB1 de animales salvajes inmunizados, indicando que en condiciones no solo homeostáticas sino también de activación los elevados niveles de BAFF conducen a una reducción en la expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales.

Discusión

La importancia del receptor inhibitorio FcγRIIb en lo que concierne a la modulación de la respuesta y la tolerancia humoral ha sido ampliamente estudiada (Smith y Clatworthy, 2010) y los estudios estuvieron principalmente enfocados en el análisis del rol que posee FcγRIIb al regular la respuesta de LiB activados de manera específica vía su BCR. Sin embargo, poco se sabía de la expresión diferencial de este receptor en las distintas subpoblaciones de LiB y cuál sería su rol en la respuesta inmune humoral. En este trabajo de tesis demostramos que existe una expresión diferencial de FcγRIIb en las distintas subpoblaciones de LiB maduros, encontrándose altamente expresado en los LiB1 peritoneales. Pudimos demostrar también que el microambiente de la cavidad peritoneal no influye en la expresión de FcγRIIb, ya que en otros Li peritoneales como los B2 peritoneales los niveles de este receptor fueron bajos y similares a los de los LiB esplénicos. Los mayores niveles de expresión de FcγRIIb en LiB1 peritoneales estuvieron vinculados a una mayor expresión de marcadores de activación y de diferenciación hacia célula secretante de Acs. Estos resultados se correlacionan con datos previos provistos por la literatura (Fairfax y col., 2007; Tumang y col., 2005) en los cuales se pone en evidencia una cierta analogía funcional entre los LiB1 y las células secretantes de Acs.

Los altos niveles de expresión de FcγRIIb y de Bim, en los LiB1 peritoneales, se asociaron con una alta susceptibilidad de estas a células a la muerte mediada por el entrecruzamiento de este receptor, posicionando a FcγRIIb como un importante mediador de la supervivencia de LiB1 peritoneales en condiciones fisiológicas. Esta conclusión adquiere aun más relevancia cuando se tiene en cuenta que la susceptibilidad a la apoptosis vía Fas/Fas-L es similar entre LiB1 peritoneales y LiB2 esplénicos. Estos resultados se contraponen a los obtenidos por Masuda y col (Masuda y col., 1997), los cuales sostienen

que los LiB1 peritoneales son resistentes a la muerte por apoptosis mediada por Fas. De manera interesante y con argumentos a favor de nuestros resultados, este mismo grupo de trabajo reportó que la deficiencia de Fas en LiB1 lleva a la exacerbación de anemia hemolítica autoinmune observada en un modelo de animales transgénicos en el cual los LiB1 son los principales responsables de la producción de auto Acs (Watanabe y col., 2002). En este modelo de autoinmunidad, la deficiencia de Fas en los LiB1 ayudaría a estas células (junto con los incrementados niveles séricos de IL10) no solo a escapar de la apoptosis vía Fas/FasL sino también a migrar hacia ganglios mesentéricos y lámina propia para diferenciarse en células secretantes de auto Acs.

Estudios previos demostraron que FcγRIIb es crucial para el mantenimiento de la tolerancia de los LiB, ya que animales deficientes en este receptor desarrollan espontáneamente anticuerpos anti-ADN y anti-nucleares (Bolland y col., 2002), lo cual deriva en una glomerulonefritis. En este trabajo de tesis observamos que ratones deficientes en FcγRIIb, con base genética 129;B6, presentan un incrementado número de LiB1 peritoneales, hecho que ha sido reportado en otros modelos animales de autoinmunidad (Fletcher y col., 2006; Hayakawa y col., 1983; Ishida y col., 2006; Mohan y col., 1998; Pao y col., 2007; Sato y col., 1996; Whyburn y col., 2003). Por su parte los animales deficientes en FcγRIIb tienen números similares de LiB esplénicos y LiB2 peritoneales comparados con animales salvajes. Para generar la cepa de ratón 129;B6 FcγRIIb^{-/-} se utilizan células madre provenientes de ratones 129, y a través de técnicas de manipulación génica se les elimina la expresión del gen fcgr2b. Luego se seleccionan las células que efectivamente eliminaron la expresión de ese gen y se las introducen en hembras de la cepa C57BL/6 pseudo-preñadas y finalmente, al nacer, se seleccionan las crías FcγRIIb^{-/-}. Un estudio reciente reveló que animales híbridos entre la cepa 129 y

la cepa C57BL/6, genotipo ampliamente utilizados para la generación de animales modificados genéticamente, desarrollan espontáneamente autoinmunidad (Bygrave y col., 2004). Sumado a este hallazgo, se encuentra el reporte de Boross y col (Boross y col., 2011) en el cual demuestran que animales deficientes en FcγRIIb, pero con una base genética pura de la cepa C57BL/6 (B6, FcγRIIb^{-/-}), presentan LiB con un fenotipo de hiperactividad, pero no llegan a desarrollar autoinmunidad. Estos datos sugieren que interacciones epistáticas entre el genoma de animales C57BL/6 y la región derivada de las células madre 129, y no la deficiencia de FcγRIIb, causaría la pérdida de tolerancia observada en animales 129;B6 FcγRIIb^{-/-}. En esta tesis doctoral utilizamos animales de la cepa 129;B6 FcγRIIb^{-/-} y como referimos previamente, estos animales mostraron un incrementado número de LiB1 peritoneales. Es válido señalar que en ninguno de los artículos mencionados (Boross y col., 2011; Bygrave y col., 2004) se evaluó ni el número de LiB1, ni la supervivencia de los mismos. Asimismo, el fenotipo de hiperactivación presente en los animales B6 FcγRIIb^{-/-} podría estar vinculado a una aumentada actividad de los LiB1. Consecuentemente, es necesario realizar estudios adicionales para poder dilucidar el rol que tiene el haplotipo 129;B6 en el mantenimiento de la homeostasis de los LiB1.

Como consecuencia del incrementado número de LiB1 peritoneales, los ratones deficientes en FcγRIIb mostraron un incremento en los niveles séricos de anticuerpos naturales (IgM e IgG anti-PtC). En contraste con nuestros resultados, Clatworthy y col (Clatworthy y Smith, 2004) no encontraron diferencias en los títulos de Acs naturales presentes en animales deficientes en FcγRIIb cuando se los compara con los títulos de los animales salvajes. Las causas de estas discrepancias son poco claras pero las podemos atribuir a diferencias metodológicas que incluyen la especificidad de los Acs

determinados. Un gran porcentaje de la población de LiB1 tiene BCRs que reconocen al fosfolípido modificado PtC (Mecolino y col., 1988), por lo cual en éste trabajo de tesis se analizó dicha especificidad en los Acs naturales evaluados. Los anticuerpos naturales están dirigidos no solo contra estructuras conservadas presentes en los microorganismos sino también contra proteínas o lípidos propios que, luego de sufrir cambios oxidativos o enzimáticos, pueden ser reconocidos por estos Acs. Tal es el caso del abundante fosfolípido PtC que al ser oxidado, por procesos que pueden implicar la apoptosis celular, genera compuestos de tipo aldehídos los cuales al formar interacciones covalentes con proteínas o lípidos pueden ser reconocidos por los Acs naturales (Lutz y col., 2009). Por otra parte, es conocido que la composición de la flora intestinal regula el balance entre distintos tipos celulares (Ivanov y col., 2008), pudiendo así también influir en la especificidad de los Acs naturales. Por lo cual, las diferencias entre la microbiota de nuestros animales, y la de los animales analizados por Clatworthy y col (2004), pueden llegar a generar las discrepancias antes mencionadas.

Determinamos que la pérdida de expresión de FcγRIIb se asocia con un incremento en el tamaño de la población de LiB1, y este incremento no pudo ser explicado por la expresión diferencial de proteínas involucradas en la activación, proliferación y supervivencia de los LiB1 o LiB como lo son p-erk 1/2 (Holodick y col., 2009b), p-Stat3 (Karras y col., 1997) y Bim (Craxton y col., 2005), ya que los LiB1 de animales salvajes y deficientes en FcγRIIb presentaron niveles de expresión de estas proteínas similares.

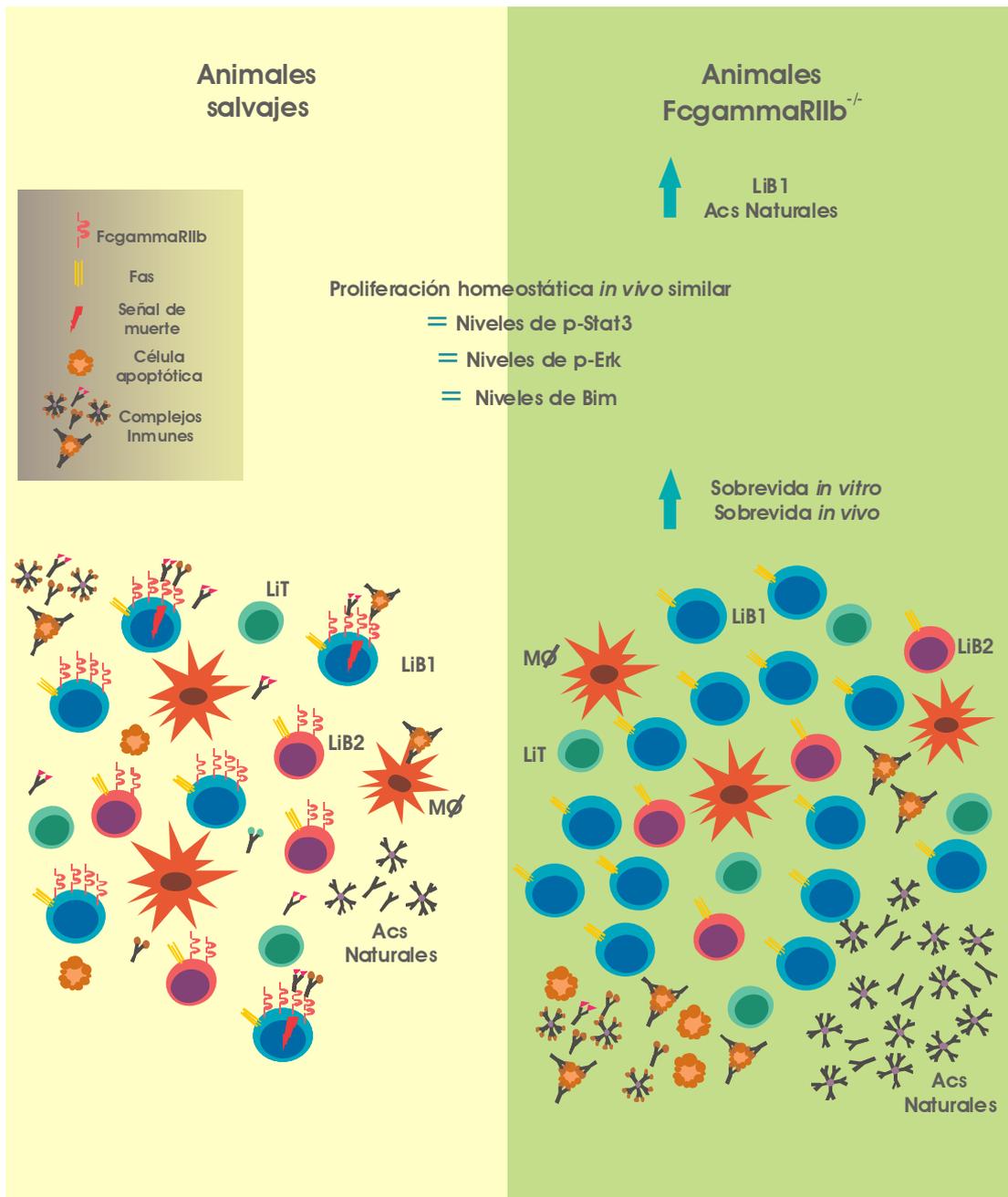


Figura D1: Esquema representativo de los fenómenos observados en la población de LiB1 en animales FcγRIIb^{-/-}.

De la misma manera el aumento en la población de LiB1 en animales FcγRIIb^{-/-} no fue consecuencia de un aumento en la capacidad de proliferación *in vivo* de los LiB1. Finalmente, observamos que la prolongada supervivencia *in vitro* e *in vivo* de los LiB1 de animales FcγRIIb^{-/-} fue la causa del incrementado número de LiB1 presentes en ratones FcγRIIb^{-/-}. Este fenómeno podría estar relacionado con una disminuida susceptibilidad a la muerte gatillada por distintas señales. Es probable que bajo condiciones de “no enfermedad” o de homeostasis *in vivo*, los complejos inmunes circulantes provean señales apoptóticas a LiB1 que expresan FcγRIIb de manera competente (Heyman, 2003; Xiang y col., 2007) y que este mecanismo regulador esté ausente en LiB1 deficientes en FcγRIIb.

Las variaciones fisiológicas en la expresión del receptor FcγRIIb humano y murino tanto a nivel génico, con polimorfismos a nivel del promotor del gen de este receptor, como los cambios en la expresión de FcγRIIb que pueden ser inducidos por citoquinas o señales de origen microbiológico, pueden tener efectos sustanciales en la función de este receptor. Muchos factores pueden influenciar la vía de señalización de FcγRIIb, al cambiar la expresión relativa del mismo (Smith y Clatworthy, 2010). Durante esta tesis se demostró que factores exógenos como ligandos de los TLR e IL-4 cambian los niveles de expresión de FcγRIIb, impactando en la supervivencia de los LiB1. Los LiB1 peritoneales y los LiB2 esplénicos ambos activados con CpG no tuvieron diferencias en la susceptibilidad a la muerte inducida vía FcγRIIb, a pesar del hecho que los LiB1 activados con CpG expresaron mayores niveles de FcγRIIb. Este dato indica que no hay una estricta relación lineal entre los niveles de expresión de FcγRIIb y la susceptibilidad a la apoptosis inducida por este receptor, sugiriendo que habría un umbral de expresión de FcγRIIb a partir del cual las células se vuelven igualmente vulnerables a la muerte vía FcγRIIb. Es importante destacar que elevados niveles de expresión de FcγRIIb en LiB se asociaron con la capacidad de estas células para secretar Acs. Actualmente la identificación de Células Plasmáticas (CP) se realiza evaluando la expresión de CD138 (Syndecan-1) en combinación con una baja expresión de B220; sin embargo se reportó que células funcionalmente identificadas como CP eran Syndecan-1 neg (Kallies y col., 2004; Merino y col., 2010). Los datos analizados en conjunto nos hacen proponer que: la expresión de FcγRIIb en combinación con la expresión de Blimp-1 podrían ser utilizados para identificar células secretantes de Acs o asimismo CP (células con alta expresión de FcγRIIb y Blimp-1).

A fines de la década del 90 se describieron por primera vez dos citoquinas, BAFF (B cell activating factor) y APRIL (a proliferation-inducing ligand), (Hahne y col., 1998; Schneider y col., 1999; Shu y col., 1999) las cuales son conocidas como factores cruciales en el mantenimiento de la supervivencia de los LiB (Mackay y col., 2003). Ambas citoquinas son proteínas transmembrana tipo II, que forman homotrímeros, y poseen un sitio consenso de tipo furina, en el cual actúan distintas enzimas, necesarias para que BAFF y APRIL adquieran la forma de citoquina soluble (Lopez-Fraga y col., 2001; Schneider y col., 1999).

Tanto BAFF como APRIL son producidos por células de la inmunidad innata como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (Mackay y col., 2003). La producción de estas citoquinas se ve incrementada no solo en presencia de interferones Tipo I, INF gamma, IL-10, G-CSF, sino también al activarse los receptores tipo Toll (Boule y col., 2004). Además, LiT y LiB activados y LiB de pacientes con leucemia linfocítica crónica producen BAFF y en este último caso, fue descrito que BAFF actuaría como un factor de supervivencia de las células tumorales (Chu y col., 2007; Kern y col., 2004; Mackay y Leung, 2006). Estudios recientes indican que BAFF y APRIL también pueden ser producidas por células no hematopoyéticas como citotrofoblastos placentarios, osteoclastos de pacientes con mieloma múltiple, células epiteliales de amígdalas y de vías aéreas, células epiteliales de glándulas salivales, astrocitos de pacientes con linfomas en Sistema Nervioso Central y astrocitos de pacientes con Esclerosis Múltiple (Abe y col., 2006; Ittah y col., 2008; Kato y col., 2006; Krumbholz y col., 2005; Langat y col., 2008).

BAFF y APRIL ejercen sus efectos al interactuar con sus receptores específicos, dentro de los cuales se encuentran BAFF-R (Receptor de BAFF), TACI (Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor) y BCMA (B cell maturation Antigen). BAFF se une específicamente a BAFF-R, pero también ejerce sus

efectos al interactuar con TACI y BCMA. Por su parte APRIL ejerce sus efectos al interactuar con TACI y con BCMA.

En animales deficientes en BAFF o en BAFF-R se puede observar un bloqueo en el estadio de diferenciación de LiB inmaduros conocidos como T1, con lo cual en estos animales no hay LiB de ZM ni LiB2 convencionales (Miller y Hayes, 1991; Schiemann y col., 2001; Thompson y col., 2001). Sin embargo, el número de LiB1 peritoneales no se ve afectado. Por otro lado, ratones deficientes en APRIL poseen una ontogenia normal de LiB, pero el cambio de isotipo hacia IgA se ve afectado. Ha sido descrito que tanto BAFF como APRIL promueven el cambio de isotipo a IgA de manera T independiente y en este proceso están involucrados tanto TACI como BAFF-R (Castigli y col., 2005).

TACI posee roles duales en el desarrollo de LiB. Por un lado animales deficientes en TACI presentan elevados niveles séricos de auto Abs, daño renal y presencia de infiltrados tumorales en distintos órganos, eventos causados por un excesivo número de LiB esplénicos. Sin embargo Seshasayee y col. no definen si alguna subpoblación de LiB se encuentra principalmente expandida (Seshasayee y col., 2003). Por el otro lado la expresión de TACI es requerida para que se produzca una eficiente respuesta humoral contra Ags T-independientes tipo II. Como fue reportado previamente, y como también nosotros hemos demostrado en este trabajo de tesis, los niveles de expresión de TACI son mayores en LiB1 peritoneales y LiB de ZM, células que participan activamente en la respuesta humoral frente a Ags T-independientes Tipo II. Por lo cual es probable que a través de TACI se provean señales positivas de maduración y/o sobrevivencia a los plasmablastos derivados de estas células (Mantchev y col., 2007). Recientemente, se ha descrito que ratones deficientes en BCMA, son saludables, sin embargo la sobrevivencia de las CP de médula ósea se ve reducida (O'Connor y col., 2004).

Hasta la fecha se han identificado algunos targets que tiene BAFF para poder cumplir con su rol anti-apoptótico sobre los LiB. Así, es conocido que BAFF no solo aumenta la expresión de factores anti- apoptóticos como A1, Bcl-x(L), Bcl-2 y Pim-2 (Bossen y Schneider, 2006; Hatada y col., 2003; Hsu y col., 2002; Lesley y col., 2004), sino que también disminuye la expresión de factores pro- apoptóticos como Bim (Craxton y col., 2005). En este trabajo de tesis, revelamos un efecto adicional de BAFF el cual involucra la disminución en los niveles de expresión de FcgammaRIIb en LiB1 peritoneales activados con CpG y la consecuente protección de estas células a la muerte mediada por éste receptor. La apoptosis que se gatilla por el entrecruzamiento de FcgammaRIIb es mediada por la proteína pro-apoptótica Bim (Xiang y col. 2007), por lo tanto moléculas como BAFF que pueden disminuir no solo la expresión de Bim sino también la expresión de FcgammaRIIb pueden proteger a los LiB1 de la muerte vía FcgammaRIIb. El efecto de BAFF se vio circunscripto a la regulación de la expresión de FcgammaRIIb en los LiB1 y no se hallaron modificaciones en la expresión de otros reguladores negativos de los LiB como lo es CD22. Por otro lado, especulamos que los mayores niveles de expresión de TACI y el mayor porcentaje de expresión de BCMA en los LiB1 estarían vinculados al efecto preferencial de BAFF sobre la regulación negativa de FcgammaRIIb en estas células.

Durante los comienzos del siglo XXI, casi de forma consecutiva, dos grupos de trabajo demostraron que la sobre-expresión de BAFF estaba vinculada al desarrollo de enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Gross y col., 2000; Mackay y col., 1999) y enfermedad de Sjogren (Groom y col., 2002). Para ello, hicieron uso de ratones BAFF Tg los cuales poseen elevados niveles de esta citoquina en suero, presentan altos títulos de auto Acs, infiltrados de LiB en glándulas salivales y daño renal. Más tarde, fue reportado que en los animales BAFF Tg no hay una pérdida total de

tolerancia a nivel del desarrollo de LiB, sino que altos niveles de BAFF estarían manteniendo la supervivencia de LiB que poseen BCR autoreactivos de baja afinidad (Thien y col., 2004). Se demostró que animales BAFF Tg y a su vez deficientes en LiT continuaban presentando la patología autoinmune, indicando que la presencia de LiT no es requerida para el desarrollo de autoinmunidad en los ratones BAFF Tg. En este trabajo adjudican un rol importante a la activación de LiB vía TLR, ya que animales que carecen de MyD88, proteína adaptadora involucrada en el señalamiento de los receptores tipo Toll, no desarrollan autoinmunidad (Groom y col., 2007). En estos animales la actividad de los LiB1 peritoneales está asociada con la nefritis que presentan los mismos (Fletcher y col., 2006). Estos autores apoyan la hipótesis de que los LiB1 activados vía TLRs aumentan la expresión de TACI y que la coestimulación de estas células con BAFF y CpG *in vivo* haría que las mismas produzcan altos niveles de auto Abs, quienes son los principales causantes del daño renal presente en los animales BAFF Tg. Durante esta tesis observamos, como ya había sido previamente reportado (Fletcher y col. 2006), que altos niveles séricos de BAFF *in vivo* (animal BAFF-Tg) pueden de manera eficiente expandir la población de LiB1. La autoinmunidad presente en animales BAFF-Tg ha sido vinculada con la función exacerbada de LiB1, los cuales pueden ser detectados en los riñones extremadamente dañados de estos animales (Fletcher y col. 2006). Por lo tanto, la identificación de señales que faciliten la apoptosis de los LiB1 podría conducir a desarrollar herramientas para combatir la auto-reactividad que ellas generan. Es probable que el alto número de LiB1 peritoneales presentes en animales BAFF-Tg sea mantenido no solo por el incremento o disminución de factores anti y pro- apoptóticos respectivamente sino porque BAFF también es capaz de disminuir los niveles de expresión de FcγRIIb, y consecuentemente protege los LiB1 de la muerte mediada por el entrecruzamiento de este receptor.

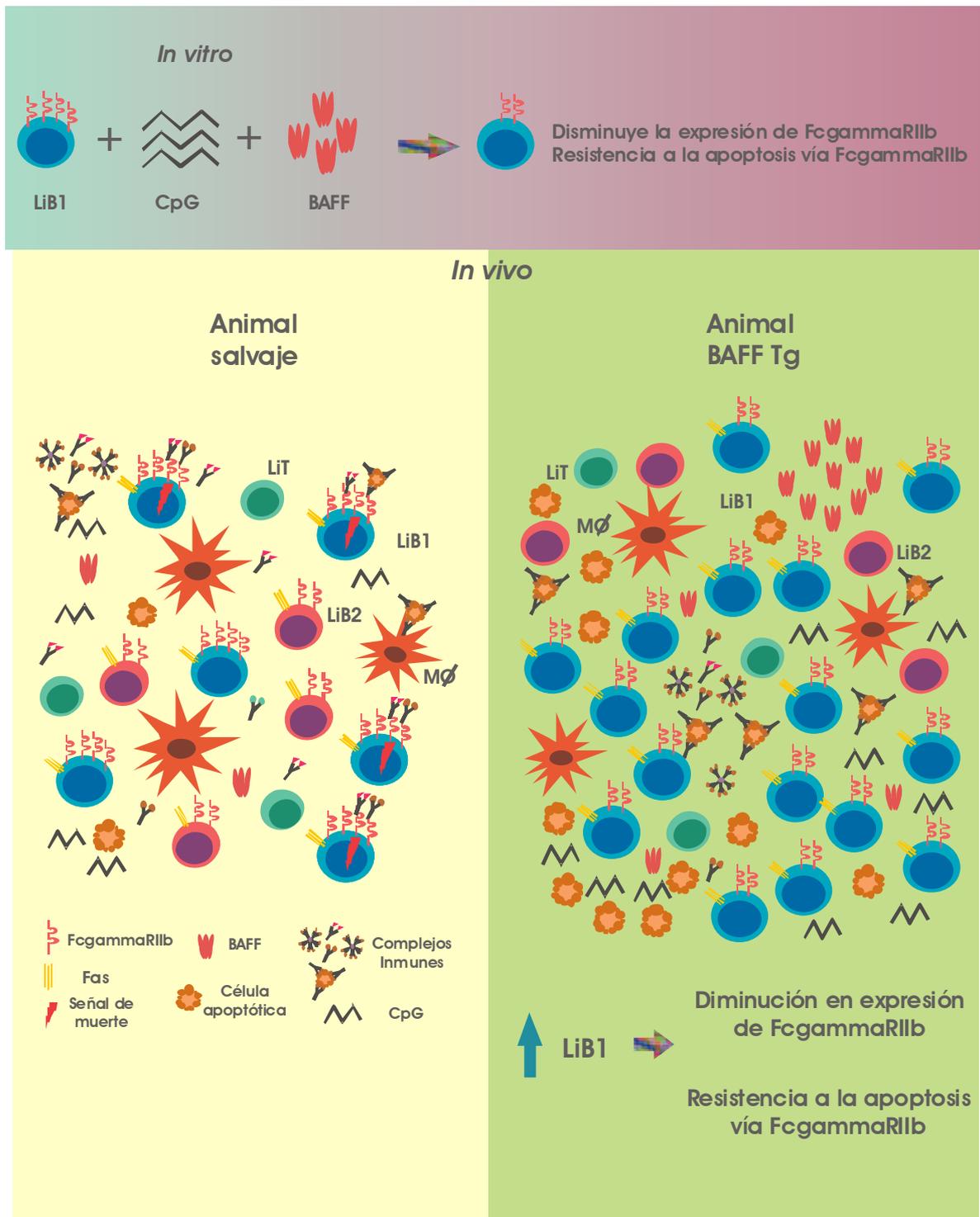


Figura D2: Esquema representativo del efecto de BAFF in vitro e in vivo sobre la expresión de FcγRIIb en LiB1.

En resumen, en este trabajo de tesis se proveen de evidencias que otorgan a FcγRIIb un rol importante en el control de la supervivencia de LiB1 peritoneales. En esta tesis doctoral describimos un nuevo mecanismo de acción a través del cual BAFF protege a los LiB1 activados de la muerte inducida por FcγRIIb. Con vista al emergente rol que poseen moléculas capaces de bloquear *in vivo* la actividad de BAFF (Ding y Jones, 2006; Navarra y col.; Stohl y col.), la corrección de los niveles de expresión de FcγRIIb con estos agentes farmacológicos provee un efecto adicional, a los ya previamente conocidos (Craxton y col., 2005), para poder interferir con la patogénesis de procesos autoinmunes y restaurar de esta manera la tolerancia hacia lo propio.

Materiales y Métodos

REACTIVOS

Animales

Reactivos empleados para cultivo celular

Anticuerpos

MÉTODOS DE ENSAYO

1. Obtención de suero y suspensiones celulares

Suero

Células totales de peritoneo

LiB1 y LiB2 de peritoneo

Células totales de bazo

LiB2 esplénicos

2. Citometría de flujo

Marcación de superficie

Marcación intracelular de IgM

Marcación intracelular de Blimp-1, pStat-3, p-Erk ½ y BIM

Tinción con TMRE

Marcación para determinar incorporación de Bromo-deoxi-uridina

3. Cultivo celular

4. Inducción de apoptosis

5. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Determinación de Acs específicos contra Fosfatidilcolina

6. ELISPOT (Enzyme-linked Immunospot assay)

7. Obtención de lisados celulares

8. Determinación de proteínas

9. SDS-PAGE y Western Blot

10. Obtención de RNA

11. Retro-transcripción reversa

12. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

13. Tratamientos in vivo

Tratamiento con Bromodeoxiuridina

Tratamiento con CpG-ODN

Transferencia adoptiva de LiB1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

REACTIVOS

Animales

Para los experimentos realizados en esta tesis ratones hembras de las siguientes cepas fueron utilizados:

- C57BL/6, de 12-48 semanas de edad, provenientes de la Universidad Nacional de La Plata o endocriados en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
- B6;129 Fcgr2b^{-/-}, de 12-48 semanas de edad, provenientes de Jackson Laboratories (EEUU) y endocriados en la Pontificia Universidad Católica de Chile y en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
- C3H/CBA; C57BL/6-BAFF-Transgénicos de 12 semanas, generosamente donados por el Dr. David Nemzaee (The Scrips Reseach Institute, La Jolla CA, EEUU) y endocriados en el bioterio del Seattle Children´s Reseach Institute (Seattle, EEUU).
- NOD-SCID de 8-10 semanas provenientes de Jackson Laboratories (EEUU) y endocriados en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
- B6/uMT de 8-15 semanas provenientes del bioterio del Seattle Children´s Reseach Institute (Seattle, EEUU) y endocriados en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Reactivos químicos empleados en cultivos celulares

RPMI 1640 (GIBCO), SBF (GIBCO), L-glutamina (Glutamax, GIBCO), EDTA fueron adquiridos en Invitrogen (EEUU). Buffer de lisis para globulos rojos, 2-mercaptoetanol, ASB y el LPS fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co (EEUU). CpG-oligonucleótido fue adquirido en Operon Biotechnologies Inc (Alabama, EEUU).

Las citoquinas de ratón recombinantes BAFF e IL-4 fueron adquiridas en Axxora LLC (San Diego CA, EEUU) y Peprotech (EEUU) respectivamente.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados durante el desarrollo de esta tesis, contra diferentes proteínas murinas, fueron los siguientes:

Especificidad	Marca	Técnica	Empresa
CD5	PE	Citometría de Flujo	eBioscience
CD11b	FITC	Citometría de Flujo	eBioscience
CD11b	Biotina	Citometría de Flujo	eBioscience
CD16/CD32	PerCPCy5.5	Citometría de Flujo	eBioscience
CD16/CD32		Cultivo Celular	BD Bioscience
CD19	PE	Citometría de Flujo	eBioscience
CD21	PE	Citometría de Flujo	eBioscience
CD22	PE	Citometría de Flujo	eBioscience
CD23	FITC	Citometría de Flujo	eBioscience
CD23	APC	Citometría de Flujo	eBioscience
CD40		Cultivo Celular	eBioscience
CD80	PE	Citometría de Flujo	BD Bioscience

Especificidad	Marca	Técnica	Empresa
CD138	APC	Citometría de Flujo	eBioscience
Actina		Western Blot	Santa Cruz Biot.
BAFF-R	FITC	Citometría de Flujo	eBioscience
BCMA	FITC	Citometría de Flujo	R&D
BIM		WB y CF	Cell Signaling
Blimp-1	PE	Citometría de Flujo	Santa Cruz Biot. Inc
B220	APC	Citometría de Flujo	eBioscience
B220	Pe Cy7	Citometría de Flujo	eBioscience
Fas	PE	Citometría de Flujo	eBioscience
IgG conejo	FITC	Citometria de Flujo	Invitrogen
IgG conejo	POD	Western Blot	Santa Cruz Biot. Inc
IgG		ELISA	Sigma
IgG	POD	ELISA	Sigma
IgG		ELISPot	Southern Biotech
IgG	Biotina	ELISPot	Southern Biotech
IgM	FITC	Citometría de Flujo	Southern Biotech
IgM		ELISA	Sigma
IgM	POD	ELISA	Sigma
IgM		ELISPot	Southern Biotech
IgM	Biotina	ELISPot	Southern Biotech
PD-L2	PE	Citometría de Flujo	eBioscience
p-Erk 1/2	Alexa 647	Citometría de Flujo	Cell Signaling

Especificidad	Marca	Técnica	Empresa
p-Stat-3	PE	Citometría de Flujo	Cell Signaling
TACI	PE	Citometría de Flujo	eBioscience

METODOS DE ENSAYO

1. Suero

Para obtener suero, la sangre de animales previamente anestesiados de forma tópica con clorhidrato de proparacaína al 0,5% fue extraída mediante punción del seno retro-orbital. Luego la sangre fue centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm y a continuación el suero fue separado y conservado a -20°C para su posterior utilización.

2. Obtención de suspensiones celulares

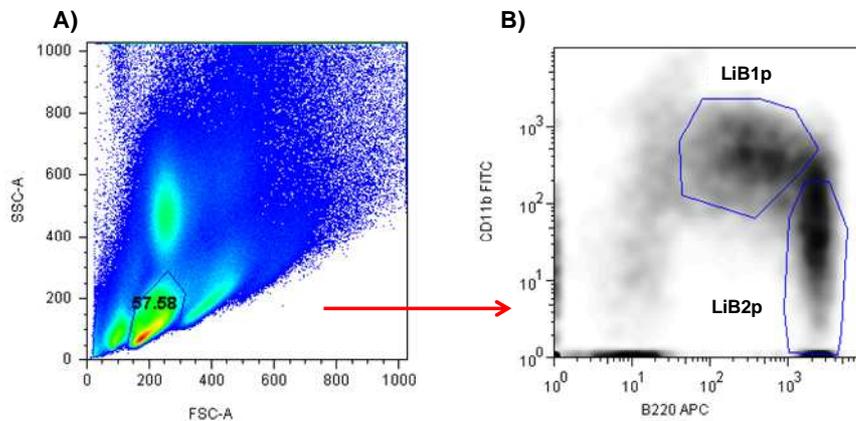
Células totales de cavidad peritoneal

Las células peritoneales fueron extraídas mediante lavados de la cavidad peritoneal utilizando pipetas Pasteur en condiciones de esterilidad. Se realizaron 4 lavados por cada animal, empleando 2 ml de Solución Fisiológica- 2% SBF en cada lavado. Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas a las concentraciones indicadas más abajo.

LiB1 y LiB2 peritoneales

LiB1 y LiB2 peritoneales fueron purificados a través de “cell-sorting”. Para ello, las células peritoneales fueron resuspendidas en PBS- 2mM EDTA- 2% SBF (buffer Sort) y posteriormente incubadas con Acs anti B220 y anti CD11-b, marcados con distintos fluorocromos, por 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas con buffer Sort y luego las suspensiones celulares se pasaron por mallas de nylon estéril con poros de 40 μ m (BD Bioscience). Finalmente las células fueron adquiridas en el sorteador de células (FACSAria, BD Bioscience, San Diego, EEUU). El porcentaje de pureza obtenido fue del 95-98% para LiB1 y 96-98% para LiB2.

En la figura a continuación, se muestra a modo de ejemplo, de qué manera fueron realizados los ensayos de “cell sorting”. En **A** se muestra un gráfico de 2 parámetros que evalúa el tamaño (FSC-A) vs la granularidad citoplasmática (SSC-A) de células obtenidas de cavidad peritoneal. En el mismo puede observarse una región que delimita la población de Li. Luego la población de Li fue seleccionada (Flecha roja) y en esta población la expresión de B220 y CD11b fue analizada (**B**). Finalmente, las poblaciones de LiB1p ($B220^{int/low} CD11b^{+}$) y de LiB2p ($B220^{high} CD11b^{-}$) fueron seleccionadas y obtenidas en tubos individuales.



Células totales de B de bazo

Los bazos de los animales fueron extraídos y recolectados en esterilidad en capsulas de Petri de 60 mm conteniendo 5-10 ml de Solución fisiológica- SBF 2%. Los órganos fueron disgregados mecánicamente utilizando émbolos estériles y una malla de acero inoxidable. La suspensión celular fueron centrifugada y el pellet se trató por 5 minutos con 2 ml de buffer Tris-HCL, pH 7,5 conteniendo 8,3 g/L de NH₄Cl (Lysing Buffer, Sigma) para producir la lisis de los glóbulos rojos. Luego las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos y lavadas 2 veces con Sol fisiológica SBF 2%.

LiB2 de bazo

LiB2 de bazo fueron purificados a través de “cell-sorting”. Para ello, células esplénicas totales fueron resuspendidas en PBS- 2mM EDTA- 2% SBF (Buffer Sort) y posteriormente incubadas con Acs anti-B220 y anti-CD23, marcados con distintos fluorocromos, por 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas con Buffer Sort y luego las suspensiones celulares se pasaron por mallas de nylon estéril con poros de 40 um (BD Bioscience). Finalmente las células fueron adquiridas en el sorteador de células (FACSAria, BD Bioscience, San Diego, USA). El porcentaje de pureza fue del 94-98%.

3. Citometría de flujo

Marcación de superficie

Las distintas poblaciones celulares fueron incubadas por 30 minutos a 4°C con diferentes Acs marcados con PE, FITC, APC, PECy7, PerCPCy5,5 o biotina, diluidos en buffer de lavado (Solución fisiológica, SBF 2%) a un volumen final de 25 ul. Luego, las células fueron lavadas y una tercera incubación de 30 minutos con estreptavidina marcada con fluorocromos (APC o PerCPCy5,5) fue realizada cuando se utilizaron Acs marcados con biotina. Finalmente, las células fueron resuspendidas en buffer de adquisición (FACS Flow, BD Bioscience).

Marcación intracelular de IgM

Para la determinación intracelular de IgM, células previamente teñidas en su superficie, fueron incubadas con un Ac específico para IgM sin marca (Southern Biotech) con el objetivo de bloquear la IgM expresada en la superficie celular de los LiB. Luego, las células fueron fijadas mediante incubación con solución CytoFix/CytoPermTM (BD Bioscience) por 30 minutos a 4°C y permeabilizadas mediante dos lavados con Perm /WashTM (BD Bioscience). Posteriormente, las células fueron incubadas por 30 minutos con un Ac monoclonal (Southern Biotech) específico para IgM marcado con FITC, diluido en solución Perm /WashTM a 4°C y lavadas 2 veces con buffer de lavado. Finalmente las células fueron resuspendidas en buffer de adquisición.

Marcación intracelular de Blimp-1 y Bim.

Para la determinación intracelular de Blimp-1 y Bim, las células previamente teñidas en su superficie, como se describió previamente, fueron fijadas mediante incubación con buffer de fijación el cual contiene formaldehído (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) por 30 minutos a T° ambiente. Luego, las células fueron lavadas con PBS y permeabilizadas mediante una incubación de 5 minutos a T° ambiente con buffer de permeabilización frío que contiene metanol (Santa Cruz Biotechnology, EEUU). Luego de lavar las células con PBS, las mismas fueron incubadas con los Acs específicos marcados con fluorocromos diluidos en un buffer de lavado (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) durante 25 minutos en hielo y al resguardo de la luz. A continuación las células fueron lavadas 2 veces con PBS y finalmente fueron resuspendidas en buffer de adquisición.

Marcación intracelular de p-Stat-3, p-Erk ½.

Para la determinación intracelular de p-Stat-3 y p-Erk ½, células previamente teñidas en su superficie, fueron fijadas mediante incubación con solución CytoFix/CytoPerm™ (BD Bioscience) por 30 minutos a 4°C y permeabilizadas mediante dos lavados con Perm /Wash™ (BD Bioscience). Posteriormente, las células fueron incubadas por 30 minutos con los Acs específicos marcados con fluorocromos, diluidos en solución Perm /Wash™ a 4°C y lavadas 2 veces con buffer de lavado. Finalmente las células fueron resuspendidas en buffer de adquisición.

Tinción con TMRE: Determinación del potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Para evaluar la pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial, se utilizó un colorante catiónico lipofílico altamente fluorescente, tetrametil-rodamina etil ester (TMRE), ya que su retención en las células depende del mantenimiento del potencial $\Delta\psi_m$ (Farkas y col., 1989; Jayaraman, 2005; Ricci y col., 2003). Los LiB fueron cultivados por 18 horas en las diferentes condiciones de cultivo, luego fueron resuspendidos en buffer HEPES con 50nM de TMRE y se incubaron por 30 minutos a 37°C. Las células se analizaron por citometría de flujo en base a la fluorescencia detectada en el canal FL2 (585 nm).

Marcación para determinar la incorporación de Bromo-deoxi-uridina

Para determinar la proliferación celular *in vivo*, células peritoneales de animales, a los cuales durante 5 días se les dio Bromo-deoxi-uridina en el agua de beber, fueron obtenidas. Luego, las células fueron teñidas en su superficie, fijadas mediante incubación con solución CytoFix/CytoPermTM (BD Bioscience) por 30 minutos a 4°C y permeabilizadas mediante un lavado con Perm /WashTM (BD Bioscience). Posteriormente, las células fueron resuspendidas en buffer CytoPerm Plus (BD Bioscience) por 10 minutos a 4°C y lavadas con Perm /WashTM. Una nueva fijación de las células fue realizada incubando las mismas con CytoFix/CytoPermTM por 5 minutos a 4°C, seguido de un lavado con Perm /WashTM. A continuación, la Bromo-deoxi-uridina que se incorporó al ADN fue expuesta a través del tratamiento de las células con DNAsa (30 ug/tubo) (BD Bioscience) durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar las células con Perm /WashTM, las ueron mismas incubadas con un Ac que reconoce específicamente la Bromo-deoxi-uridina, marcado con FITC (BD Bioscience)

diluido en Perm /Wash™. Finalmente las células fueron lavadas con Perm /Wash™ y resuspendidas en buffer de adquisición.

En todos los casos entre 10000 y 1×10^6 eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience) y los datos fueron analizados mediante el software Flowjo 5.7.2 (TreeStar)

4. Cultivo celular

Los LiB purificados fueron cultivados a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio RPMI completo (conteniendo 10% SBF, 2 mM L-glutamina, 50 uM 2-mercaptoetanol y 40 ug/ml gentamicina) durante 48 horas con los siguientes estímulos:

Estímulo	Concentración	Marca
Anti- μ	7,5 ug/ml	Jackson Laboratories
Anti-CD40	5 ug/ml	eBioscience
BAFF	150 ng/ml	Axxora
CpG-ODN	2 ug/ml	Operon Technologies
IL-4	25 ng/ml	Peptotech
LPS	10 ug/ml	Sigma

5. Inducción de apoptosis

Para inducir apoptosis mediada por FcγRIIb, en LiB purificados *ex vivo* o previamente estimulados, el entrecruzamiento del receptor FcγRIIb con anticuerpos anti-FcγRII/III fijados o adosados a una superficie de poliestireno fue realizado. Para ello, placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con un Ac estéril anti FcγRII/III (20 ug/ml) (BD Bioscience) diluido en PBS, o con PBS solo como control. Luego de una incubación de 15-20 horas a 4°C, la placa se lavó con PBS estéril, y en diferentes pocillos las distintas poblaciones celulares fueron colocadas. Para inducir la apoptosis vía Fas, a pocillos sin sensibilizar se les agregó un Ac estéril anti Fas (7,5 ug/ml clon Jo2 (BD Bioscience)). En dichas condiciones las células fueron cultivadas durante 18 horas a 37°C 5% CO₂.

6. ELISA

Para la determinación de Acs IgM e IgG específicos contra fosfatidilcolina, placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar) fueron sensibilizadas con 4 ug/pocillo de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Sigma-Aldrich) en n-hexano durante 2 horas a 37°C. El DPPC fue preparado a una concentración de 1 mg/ml en cloroformo y después fue disuelto a la concentración deseada, en n-hexano. Cabe destacar que la cantidad de cloroformo restante en la dilución final de DPPC es mínima, ya que este reactivo daña las placas de poliestireno. Posteriormente las placas fueron lavadas con PBS y bloqueadas con PBS conteniendo leche descremada al 5% (solución de bloqueo) durante 1 hora a 37°C. Luego los sueros, obtenidos de los animales de experimentación, fueron sembrados en los pocillos en diluciones seriadas realizadas en la solución de bloqueo e incubados durante 15-20 horas a 4°C. Las placas fueron nuevamente lavadas con PBS e incubadas con

anticuerpos anti IgM o anti IgG marcados con POD (Sigma-Aldrich) diluidos en solución de bloqueo, durante 1 hora a 37°C. A continuación se lavó con PBS y finalmente la reacción fue revelada agregando 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) (Dako, Dinamarca) y fue detenida añadiendo H₂SO₄ 1N. La densidad óptica (DO) a 450 nm fue medida en un lector de ELISA (Microplate-Reader 450, BioRad). El título de Acs anti-fosfatidilcolina (anti-PtC) fue definido como la mayor dilución del suero en la cual la DO a 450 nm fue 2 veces mayor que la densidad óptica del blanco de reacción. Los resultados obtenidos fueron expresados como log₂ 1/ título.

7. **ELISPOT**

Para evaluar la frecuencia de células productoras de IgM y de 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 (conteniendo 10% SBF, 2 mM L-glutamina, 50 uM 2-mercaptoetanol y 40 ug/ml gentamicina) durante por lo menos 2 horas a 37°C. Posteriormente, las distintas poblaciones celulares previamente obtenidas por “sorting celular” fueron incubadas durante 18 horas a 37°C 5% CO₂. Seguidamente las placas fueron lavadas con PBS- Tween 20 0,01% (líquido de lavado), 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 con líquido de lavado e incubadas con estreptavidina marcada con Fosfatasa Alcalina durante 45 minutos a T° ambiente. A continuación las placas fueron lavadas con líquido de lavado y un último lavado con PBS.

Finalmente la reacción fue revelada 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.

8. Obtención de lisados celulares

Las distintas muestras celulares, fueron lisadas mediante buffer RIPA (modified radioimmunoprecipitation buffer) (Igepal CA-630 1%, Deoxicolato de Sodio 0,5%, SDS 0,1%, PBS 1X) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (20ul/ml de RIPA) (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos en hielo. El sobrenadante obtenido luego de 10 minutos de centrifugación a 13000 rpm, que contiene las proteínas totales, fue conservado a -20°C hasta su uso.

9. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue estimada por el método de Bradford (Bradford M. M. 1976) utilizando el reactivo BioRad Protein Assay. ASB fue utilizada como estándar.

10. SDS-PAGE y Western Blot

Cantidades iguales de proteínas correspondientes a los lisados celulares fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en un aparato de

electroforesis Miniprotean III (BioRad) según las indicaciones de Laemmli UK (Laemmli y col., 1970). Brevemente las muestras fueron desnaturalizadas mediante tratamiento con calor en presencia de SDS 1% y 2-Mercaptoetanol 2mM, y luego sometidas a separación electroforética usando geles de poliacrilamida al 5% (para concentración de la muestra) y entre el 10 y 15% (para separación de proteínas). Marcadores de amplio rango de peso molecular (BenchMark™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen) fueron sembrados en paralelo. Posteriormente las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (TransBlot®, BioRad) utilizando el protocolo descrito por Towbin (Towbin y col., 1979). Luego de bloquear 1 hora a T° ambiente con PBS conteniendo leche descremada al 5%, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con los respectivos Acs primarios durante 18 hs a 4°C. A continuación las membranas fueron lavadas 3 veces de 5 minutos con PBS-Tween 20 0,05% e incubadas 1^{1/2} hora a T° ambiente con el correspondiente Ac secundario marcado con POD. Luego de 5 lavados de 5 minutos con PBS-Tween 20 0,05%, la reacción fue revelada con reactivo quimioluminiscente ECL (Western Blot Chemiluminescence Reagent, NEN Life Science Technologies, EEUU) seguido de la exposición de 3-10 minutos sobre placas radiográficas (Kodak).

Para controlar la carga proteica las membranas fueron lavadas abundantemente con PBS y luego incubadas a 37°C con agitación con stripping buffer (2-mercaptoetanol, SDS 2%, Tris-HCl 0,05M) durante 30 minutos. Luego las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 0,05% y los niveles de β-actina fueron determinados por Western Blot, utilizando un Ac primario específico para esta proteína.

11. Obtención de ARN

El ARN total fue extraído utilizando el reactivo TRIzol™ (Life Technologies) (1 ml para 1×10^7 células) según la recomendación del fabricante. Brevemente, las muestras tratadas con TRIzol fueron separadas utilizando 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol. Posteriormente, el ARN presente en la fase acuosa fue precipitado con 0,5 ml de alcohol isopropílico. Finalmente el ARN fue lavado con etanol al 75%, y resuspendido en 20 μ l de agua tratada con DEPC (dietilpicrocarbonato, inhibidor ribonucleasas).

12. Retro-transcripción reversa

La síntesis de la cadena de ADN complementario (ADNc) requerida para la amplificación por PCR fue realizada utilizando reactivos de Promega (Madison, WI, EEUU). Brevemente, una mezcla de reacción con 2 μ g de ARN total (templado), 0,8 μ g de primer de oligo(dt) 18 y agua deionizada libre de ribonucleasas hasta un volumen final de 20 μ l fue preparada en hielo. La mezcla fue incubada por 5 minutos a 70°C y enfriada en hielo. Luego, los siguientes componentes: 6 μ l de buffer de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH: 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 30 U del inhibidor de ribonucleasas, 3 μ l de una mezcla de dNTP 10 mM, y 60 U de la enzima transcriptasa reversa, M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) fueron agregados. La mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C. Finalmente, la reacción fue detenida calentando a 70°C por 10 minutos.

13. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La cuantificación relativa del ADNc fue realizada relativa a la cantidad de la enzima Hprt (Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa). En los tubos de reacción, junto con Universal PCR master mix, (Applied Biosystem), primers y probes específicos para Hprt o primers y probes específicos para fcgr2b (gen de interés) y ADNc de la muestra a analizar fueron agregados, en un volumen final de 15 ul. Tanto las probes para Hprt como las probes para fcgr2b, fueron marcadas con FAM (6-carboxifluoresceina) como fluoróforo y con TMRA (tetrametilrodamina) como colorante quencher, por el fabricante. Cabe destacar que solo se dispone del número de identificación de los primers y probes para ambos genes, único dato provisto por el fabricante (Applied Biosystem). Fcgr2b: Mn00438875_m1, Hprt: Mn00446968_m1.

La reacción de PCR fue ejecutada en un instrumento para PCR múltiple en tiempo real ABI 7500 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, EEUU)

Las reacciones fueron realizadas por duplicado y las condiciones de reacción empleadas fueron las siguientes: 50°C por 2 minutos, 1 ciclo; 95°C, 10 minutos, 1 ciclo; 95°C, 15 segundos, 45 ciclos, 60°C, 1 minuto, 1 ciclo. La cuantificación relativa de ADNc fue realizada fijando arbitrariamente un punto dentro de la fase logarítmica de la reacción en cadena para Hprt y el gen fcgr2b, de esta manera el numero de ciclos necesarios para llegar a este punto, denominándose como C_t , fue determinado.

La diferencia entre el C_t del gen cuantificado y la Hprt (delta C_t) fue calculada y la cantidad relativa del gen fcgr2b fue calculada como $2^{-\text{delta}C_t}$.

14. Tratamientos *in vivo*

Tratamiento con bromo-deoxi-uridina

Para evaluar la proliferación de LiB1 *in vivo*, a ratones salvajes (WT) y a ratones deficientes en FcγRIIb, se les dió bromo-deoxi-uridina (Sigma-Aldrich) en el agua de beber, durante 5 días consecutivos (0,8 mg/ml bromo-deoxi-uridina, 1% sacarosa). Luego los lavados peritoneales de dichos animales fueron obtenidos y la incorporación de bromo-deoxi-uridina en el ADN de los LiB1 peritoneales fue determinada.

Tratamiento con CpG-ODN

Para evaluar los cambios en la expresión de FcγRIIb *in vivo*, ratones WT y ratones BAFF-Tg, fueron inyectados por vía intra-peritoneal con 30 ug de CpG-ODN (Operon, Technologies). Ratones de ambos grupos inyectados con PBS 1X estéril, formaron parte de los grupos controles. A las 72 horas de realizada la inyección, los animales fueron sacrificados y los bazo y los lavados peritoneales fueron obtenidos para posteriormente analizar, por citometría de flujo, la expresión de FcγRIIb en las distintas subpoblaciones de LiB.

Transferencia adoptiva de LiB1

Para evaluar la sobrevivencia de LiB1 de animales salvajes y FcγRIIb^{-/-} *in vivo*, animales deficientes en LiB y LiT (NOD-SCID) fueron inyectados por vía intraperitoneal con una mezcla (50%-50%) de LiB1 provenientes de animales salvajes y FcγRIIb^{-/-} (10⁶ células totales). Para poder diferenciar a estas dos poblaciones celulares, las mismas fueron

teñidas con eFluor-670 (5 μ M eBioscience), o con CFSE (carboxi-fluorescein-succinilmidil éster 5 μ M) antes de ser inyectadas. A los 20 días de realizada la transferencia las células peritoneales de los animales inyectados fueron obtenidas y luego analizadas por citometría de flujo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos, fueron realizados mediante el Test t de Student, utilizando el software Graph Pad versión 4. Fue considerada como significativa toda diferencia que arrojara un valor de $p < 0,05$.

Producción Científica

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis fueron enviados a publicar en la siguiente revista Internacional:

FcgammaRIIb and BAFF differentially regulate peritoneal B1 cell survival. María C Amezcua Vesely, Marc Schwartz, Daniela A Bermejo, Carolina L Montes, David Rawlings, Kelly Cautivo, Alexis Kalergis, Eva V Acosta-Rodríguez and Adriana Gruppi. Actualmente en Revisión en “The Journal of Immunology”.

Durante esta Tesis participé en los siguientes Trabajos Científicos:

Trypanosoma cruzi Infection Beats the B-cell Compartment Favouring Parasite Establishment: Can we Strike First? Acosta Rodriguez EV, Zuniga EI, Montes CL, Merino MC, Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Motran CC, Gruppi A. Scand J Immunol. 2007 Aug; 66(2-3):137-42.

Peritoneum from Trypanosoma cruzi infected mice is a homing site of Syndecan-1^{neg} plasma cells which mainly provide non-parasite specific antibodies. MC Merino, CL Montes, EV Acosta-Rodríguez, DA Bermejo, MC Amezcua Vesely y A Gruppi. International Immunology. 2010; 22(5):399-410

BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease DA Bermejo, MC Amezcua Vesely, CL. Montes, MC Merino, EV Acosta-Rodríguez, y A Gruppi. Plos Neglected Tropical Diseases. 2010;4(5):e679.

Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B cell response which is a high source of non-parasite specific antibodies. Bermejo, Daniela; Amezcua-Vesely, Maria C; Kahn, Mahmood; Acosta-Rodríguez, Eva; Montes, Carolina; Merino, Maria; Toellner, K M; Mohr, Elodie; Taylor, Dale; Cunningham, A; Gruppi, Adriana. Immunology. 2010 Sep 28. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x..

***Echinococcus granulosus* glycoconjugates induce peritoneal B cell differentiation into antibody secreting cells and cytokine production.** Gustavo Mourglia-Ettlin, María C. Amezcua-Vesely, Regina Fraga, Adriana Baz, María C. Merino, Adriana Gruppi and Sylvia Dematteis. Parasite Immunol. 2011 Nov;33(11):621-31.

B cell response during protozoan parasite infections. María C Amezcua Vesely, Daniela A Bermejo, Carolina L Montes, Eva V Acosta-Rodríguez and Adriana Gruppi. Journal of Parasitology Research. Special Issue: Immunity to protozoan parasites. Noviembre 2011.

"IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils" Jimena Tosello-Boari, María Carolina Amezcua-Vesely, Daniela Andrea Bermejo, Maria Cecilia Ramello, Carolina Lucía Montes, Hugo Cejas, Adriana Gruppi and Eva Virginia Acosta-Rodríguez. Actualmente en Revisión en "PLoS Pathogens".

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis fueron presentados en las siguientes Reuniones Científicas:

Exposición Oral: **FcγRIIb: differential expression and functions in B cell subsets.** Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Cautivo KM, Montes CL, Kalergis A, Acosta Rodríguez EV, Gruppi A. First French - Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Noviembre 2010.

Presentación de Poster **"FcγRIIb y BAFF regulan diferencialmente la sobrevivencia de los Linfocitos B1"** MC Amezcua Vesely, M Schwartz, DA Bermejo, CL Montes, D Rawlings, A Kalergis, EV Acosta-Rodríguez, A Gruppi. LIX reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Tucumán. Argentina Octubre 2011

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

Abe, M., Kido, S., Hiasa, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., y Matsumoto, T. (2006). BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1313-1315.

Acosta-Rodriguez, E.V., Craxton, A., Hendricks, D.W., Merino, M.C., Montes, C.L., Clark, E.A., and Gruppi, A. (2007a). BAFF and LPS cooperate to induce B cells to become susceptible to CD95/Fas-mediated cell death. *Eur J Immunol* 37, 990-1000.

Acosta-Rodriguez, E.V., Merino, M.C., Montes, C.L., Motran, C.C., y Gruppi, A. (2007b). Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 73-83.

Acosta Rodriguez, E.V., Zuniga, E., Montes, C.L., y Gruppi, A. (2003). Interleukin-4 biases differentiation of B cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation. *J Leukoc Biol* 73, 127-136.

Adachi, M., Suematsu, S., Suda, T., Watanabe, D., Fukuyama, H., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., y Nagata, S. (1996). Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2131-2136.

Alugupalli, K.R., Akira, S., Lien, E., y Leong, J.M. (2007). MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. *J Immunol* 178, 3740-3749.

Alugupalli, K.R., Gerstein, R.M., Chen, J., Szomolanyi-Tsuda, E., Woodland, R.T., y Leong, J.M. (2003). The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *J Immunol* 170, 3819-3827.

Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., y Gerstein, R.M. (2004). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21, 379-390.

Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., y Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341-352.

Batten, M., Groom, J., Cachero, T.G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., y Mackay, F. (2000). BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 192, 1453-1466.

Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11, 34-46.

Baumgarth, N., Chen, J., Herman, O.C., Jager, G.C., y Herzenberg, L.A. (2000). The role of B-1 and B-2 cells in immune protection from influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 252, 163-169.

Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L., y Herzenberg, L.A. (1999). Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2250-2255.

Behring, y Kitasato (1965). [On the development of immunity to diphtheria and tetanus in animals]. *Dtsch Med Wochenschr* 90, 2183.

Benedict, C.L., y Kearney, J.F. (1999). Increased junctional diversity in fetal B cells results in a loss of protective anti-phosphorylcholine antibodies in adult mice. *Immunity* 10, 607-617.

Berland, R., y Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20, 253-300.

Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J.R., Tarakhovsky, A., y Bondada, S. (1996). CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274, 1906-1909.

Boes, M., Prodeus, A.P., Schmidt, T., Carroll, M.C., y Chen, J. (1998). A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 188, 2381-2386.

Bolland, S., y Ravetch, J.V. (2000). Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277-285.

Bolland, S., Yim, Y.S., Tus, K., Wakeland, E.K., y Ravetch, J.V. (2002). Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in FcgammaRIIB(-/-) mice. *J Exp Med* 195, 1167-1174.

Boross, P., Arandhara, V.L., Martin-Ramirez, J., Santiago-Raber, M.L., Carlucci, F., Flierman, R., van der Kaa, J., Breukel, C., Claassens, J.W., Camps, M., y col. (2011). The inhibiting Fc receptor for IgG, FcgammaRIIB, is a modifier of autoimmune susceptibility. *J Immunol* 187, 1304-1313.

Bos, N.A., Kimura, H., Meeuwsen, C.G., De Visser, H., Hazenberg, M.P., Wostmann, B.S., Pleasants, J.R., Benner, R., y Marcus, D.M. (1989). Serum immunoglobulin levels and naturally occurring antibodies against carbohydrate antigens in germ-free BALB/c mice fed chemically defined ultrafiltered diet. *Eur J Immunol* 19, 2335-2339.

Bossen, C., y Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18, 263-275.

Bossy-Wetzel, E., y Green, D.R. (1999). Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 434, 243-251.

Boule, M.W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., y Rifkin, I.R. (2004). Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 199, 1631-1640.

Boumsell, L., Bernard, A., Lepage, V., Degos, L., Lemerle, J., y Dausset, J. (1978). Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur J Immunol* 8, 900-904.

Brownlie, R.J., Lawlor, K.E., Niederer, H.A., Cutler, A.J., Xiang, Z., Clatworthy, M.R., Floto, R.A., Greaves, D.R., Lyons, P.A., y Smith, K.G. (2008). Distinct cell-specific control of autoimmunity and infection by FcγRIIb. *J Exp Med* 205, 883-895.

Bygrave, A.E., Rose, K.L., Cortes-Hernandez, J., Warren, J., Rigby, R.J., Cook, H.T., Walport, M.J., Vyse, T.J., y Botto, M. (2004). Spontaneous autoimmunity in 129 and C57BL/6 mice-implications for autoimmunity described in gene-targeted mice. *PLoS Biol* 2, E243.

Caligaris-Cappio, F., Gobbi, M., Bofill, M., y Janossy, G. (1982). Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 155, 623-628.

Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., y *col.* (2005). Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity* 23, 397-407.

Casali, P., Burastero, S.E., Nakamura, M., Inghirami, G., y Notkins, A.L. (1987). Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science* 236, 77-81.

Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., y Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5, 317-327.

Castigli, E., Wilson, S.A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K.P., Bram, R.J., Jabara, H., y Geha, R.S. (2005). TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med* 201, 35-39.

Clatworthy, M.R., y Smith, K.G. (2004). FcγRIIb balances efficient pathogen clearance and the cytokine-mediated consequences of sepsis. *J Exp Med* 199, 717-723.

Cleary, A.M., Fortune, S.M., Yellin, M.J., Chess, L., y Lederman, S. (1995). Opposing roles of CD95 (Fas/APO-1) and CD40 in the death and rescue of human low density tonsillar B cells. *J Immunol* 155, 3329-3337.

Coons, A.H., Leduc, E.H., y Connolly, J.M. (1955). Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med* 102, 49-60.

- Craxton, A., Draves, K.E., Gruppi, A., y Clark, E.A. (2005). BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med* 202, 1363-1374.
- Choi, Y.S., y Baumgarth, N. (2008). Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med* 205, 3053-3064.
- Chou, M.Y., Fogelstrand, L., Hartvigsen, K., Hansen, L.F., Woelkers, D., Shaw, P.X., Choi, J., Perkmann, T., Backhed, F., Miller, Y.I., y *col.* (2009). Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* 119, 1335-1349.
- Chu, V.T., Enghard, P., Riemekasten, G., y Berek, C. (2007). In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol* 179, 5947-5957.
- Dauphinee, M., Tovar, Z., y Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 31, 642-647.
- Davidson, W.F., Dumont, F.J., Bedigian, H.G., Fowlkes, B.J., y Morse, H.C., 3rd (1986). Phenotypic, functional, and molecular genetic comparisons of the abnormal lymphoid cells of C3H-lpr/lpr and C3H-gld/gld mice. *J Immunol* 136, 4075-4084.
- Ding, C., y Jones, G. (2006). Belimumab Human Genome Sciences/Cambridge Antibody Technology/GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs* 7, 464-472.
- Duber, S., Hafner, M., Krey, M., Lienenklaus, S., Roy, B., Hobeika, E., Reth, M., Buch, T., Waisman, A., Kretschmer, K., y Weiss, S. (2009). Induction of B-cell development in adult mice reveals the ability of bone marrow to produce B-1a cells. *Blood* 114, 4960-4967.
- Ehrenstein, M.R., y Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* 10, 778-786.
- Ellis, S.T., Gowans, J.L., y Howard, J.C. (1969). The origin of antibody forming cells from lymphocytes. *Antibiot Chemother* 15, 40-55.
- Fagarasan, S., Watanabe, N., y Honjo, T. (2000). Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol Rev* 176, 205-215.
- Fairfax, K.A., Corcoran, L.M., Pridans, C., Huntington, N.D., Kallies, A., Nutt, S.L., y Tarlinton, D.M. (2007). Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *J Immunol* 178, 4104-4111.
- Farkas, D.L., Wei, M.D., Febbroriello, P., Carson, J.H., y Loew, L.M. (1989). Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials. *Biophys J* 56, 1053-1069.

Fletcher, C.A., Groom, J.R., Woehl, B., Leung, H., Mackay, C., y Mackay, F. (2011). Development of autoimmune nephritis in genetically asplenic and splenectomized BAFF transgenic mice. *J Autoimmun* 36, 125-134.

Fletcher, C.A., Sutherland, A.P., Groom, J.R., Batten, M.L., Ng, L.G., Gommerman, J., y Mackay, F. (2006). Development of nephritis but not sialadenitis in autoimmune-prone BAFF transgenic mice lacking marginal zone B cells. *Eur J Immunol* 36, 2504-2514.

Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., y Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* 178, 7779-7786.

Gerber, J.S., y Mosser, D.M. (2001). Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fc γ receptors. *Microbes Infect* 3, 131-139.

Gil-Cruz, C., Bobat, S., Marshall, J.L., Kingsley, R.A., Ross, E.A., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Coughlan, R.E., Khan, M., Jensen, K.T., y col. (2009). The porin OmpD from nontyphoidal Salmonella is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9803-9808.

Gitlin, D., Hitzig, W.H., y Janeway, C.A. (1956). Multiple serum protein deficiencies in congenital and acquired agammaglobulinemia. *J Clin Invest* 35, 1199-1204.

Godin, I.E., Garcia-Porrero, J.A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F., y Marcos, M.A. (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67-70.

Gregoire, K.E., Goldschneider, I., Barton, R.W., y Bollum, F.J. (1979). Ontogeny of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells in lymphohemopoietic tissues of rat and mouse. *J Immunol* 123, 1347-1352.

Groom, J., Kalled, S.L., Cutler, A.H., Olson, C., Woodcock, S.A., Schneider, P., Tschopp, J., Cachero, T.G., Batten, M., Wheway, J., y col. (2002). Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 109, 59-68.

Groom, J.R., Fletcher, C.A., Walters, S.N., Grey, S.T., Watt, S.V., Sweet, M.J., Smyth, M.J., Mackay, C.R., y Mackay, F. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* 204, 1959-1971.

Gross, J.A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S.R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., y col. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404, 995-999.

Gu, H., Forster, I., y Rajewsky, K. (1990). Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J* 9, 2133-2140.

Ha, S.A., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T., y Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J Exp Med* 203, 2541-2550.

Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., y Tedder, T.F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7-18.

Hahne, M., Kataoka, T., Schroter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J.L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L.E., y *col.* (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188, 1185-1190.

Hardy, R.R., Kishimoto, T., y Hayakawa, K. (1987). Differentiation of B cell progenitors in vitro: generation of surface IgM+ B cells, including Ly-1 B cells, from Thy-1- asialoGM1+ cells in newborn liver. *Eur J Immunol* 17, 1769-1774.

Hastings, W.D., Tumang, J.R., Behrens, T.W., y Rothstein, T.L. (2006). Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics. *Eur J Immunol* 36, 1114-1123.

Hatada, E.N., Do, R.K., Orlofsky, A., Liou, H.C., Prystowsky, M., MacLennan, I.C., Caamano, J., y Chen-Kiang, S. (2003). NF-kappa B1 p50 is required for BLyS attenuation of apoptosis but dispensable for processing of NF-kappa B2 p100 to p52 in quiescent mature B cells. *J Immunol* 171, 761-768.

Haury, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., y Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol* 27, 1557-1563.

Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S.A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C.L., Silver, J., and Hardy, R.R. (1999). Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285, 113-116.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., y Herzenberg, L.A. (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 161, 1554-1568.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., y Herzenberg, L.A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157, 202-218.

Henkart, P.A., y Grinstein, S. (1996). Apoptosis: mitochondria resurrected? *J Exp Med* 183, 1293-1295.

Herzenberg, L.A. (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 175, 9-22.

Heyman, B. (2003). Feedback regulation by IgG antibodies. *Immunol Lett* 88, 157-161.

Hoffmann, A., Kerr, S., Jellusova, J., Zhang, J., Weisel, F., Wellmann, U., Winkler, T.H., Kneitz, B., Crocker, P.R., y Nitschke, L. (2007). Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol* 8, 695-704.

Holodick, N.E., Repetny, K., Zhong, X., y Rothstein, T.L. (2009a). Adult BM generates CD5+ B1 cells containing abundant N-region additions. *Eur J Immunol* 39, 2383-2394.

Holodick, N.E., Tumang, J.R., y Rothstein, T.L. (2009b). Continual signaling is responsible for constitutive ERK phosphorylation in B-1a cells. *Mol Immunol* 46, 3029-3036.

Hsu, B.L., Harless, S.M., Lindsley, R.C., Hilbert, D.M., y Cancro, M.P. (2002). Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 168, 5993-5996.

Hur, D.Y., Kim, D.J., Kim, S., Kim, Y.I., Cho, D., Lee, D.S., Hwang, Y., Bae, K., Chang, K.Y., y Lee, W.J. (2000). Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. *Immunol Lett* 72, 107-111.

Iruretagoyena, M.I., Riedel, C.A., Leiva, E.D., Gutierrez, M.A., Jacobelli, S.H., y Kalergis, A.M. (2008). Activating and inhibitory Fcγ receptors can differentially modulate T cell-mediated autoimmunity. *Eur J Immunol* 38, 2241-2250.

Ishida, D., Su, L., Tamura, A., Katayama, Y., Kawai, Y., Wang, S.F., Taniwaki, M., Hamazaki, Y., Hattori, M., y Minato, N. (2006). Rap1 signal controls B cell receptor repertoire and generation of self-reactive B1a cells. *Immunity* 24, 417-427.

Ishida, H., Hastings, R., Kearney, J., y Howard, M. (1992). Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 175, 1213-1220.

Itakura, A., Szczepanik, M., Campos, R.A., Paliwal, V., Majewska, M., Matsuda, H., Takatsu, K., y Askenase, P.W. (2005). An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J Immunol* 175, 7170-7178.

Ittah, M., Miceli-Richard, C., Gottenberg, J.E., Sellam, J., Eid, P., Lebon, P., Pallier, C., Lepajolec, C., y Mariette, X. (2008). Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol* 38, 1058-1064.

Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., y Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4, 337-349.

Izui, S., Kelley, V.E., Masuda, K., Yoshida, H., Roths, J.B., y Murphy, E.D. (1984). Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *J Immunol* *133*, 227-233.

Jayaraman, S. (2005). Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). *J Immunol Methods* *306*, 68-79.

Kaku, H., y Rothstein, T.L. Octamer binding protein 2 (Oct2) regulates PD-L2 gene expression in B-1 cells through lineage-specific activity of a unique, intronic promoter. *Genes Immun* *11*, 55-66.

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., y Nutt, S.L. (2004). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in *blimp-1* expression. *J Exp Med* *200*, 967-977.

Kantha, S.S. (1992). The legacy of von Behring y Kitasato. *Immunol Today* *13*, 374.

Kantor, A.B., Stall, A.M., Adams, S., y Herzenberg, L.A. (1992). Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 3320-3324.

Karras, J.G., Wang, Z., Huo, L., Howard, R.G., Frank, D.A., y Rothstein, T.L. (1997). Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is constitutively activated in normal, self-renewing B-1 cells but only inducibly expressed in conventional B lymphocytes. *J Exp Med* *185*, 1035-1042.

Kato, A., Truong-Tran, A.Q., Scott, A.L., Matsumoto, K., y Schleimer, R.P. (2006). Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol* *177*, 7164-7172.

Kern, C., Cornuel, J.F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.Y., Feldblum, S., y Kolb, J.P. (2004). Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* *103*, 679-688.

Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C.M., Kalled, S.L., Hess, D.M., Serafini, B., Aloisi, F., y *col.* (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* *201*, 195-200.

Kulik, L., Fleming, S.D., Moratz, C., Reuter, J.W., Novikov, A., Chen, K., Andrews, K.A., Markaryan, A., Quigg, R.J., Silverman, G.J., y *col.* (2009). Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* *182*, 5363-5373.

Laemmli, U.K., Beguin, F., y Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* *47*, 69-85.

- Lajaunias, F., Nitschke, L., Moll, T., Martinez-Soria, E., Semac, I., Chicheportiche, Y., Parkhouse, R.M., y Izui, S. (2002). Differentially regulated expression and function of CD22 in activated B-1 and B-2 lymphocytes. *J Immunol* 168, 6078-6083.
- Lam, K.P., y Rajewsky, K. (1999). B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J Exp Med* 190, 471-477.
- Langat, D.L., Wheaton, D.A., Platt, J.S., Sifers, T., y Hunt, J.S. (2008). Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am J Pathol* 172, 1303-1311.
- Lenardo, M., Chan, K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17, 221-253.
- Lenardo, M.J. (1997). The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol* 9, 1-5.
- Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S.L., Hess, D.M., Schwab, S.R., Shu, H.B., y Cyster, J.G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 20, 441-453.
- Lin, F.R., Kuo, H.K., Ying, H.Y., Yang, F.H., y Lin, K.I. (2007). Induction of apoptosis in plasma cells by B lymphocyte-induced maturation protein-1 knockdown. *Cancer Res* 67, 11914-11923.
- Lopes-Carvalho, T., y Kearney, J.F. (2004). Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* 197, 192-205.
- Lopez-Fraga, M., Fernandez, R., Albar, J.P., y Hahne, M. (2001). Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep* 2, 945-951.
- Lund, F.E., y Randall, T.D. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 236-247.
- Lutz, H.U., Binder, C.J., y Kaveri, S. (2009). Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol* 30, 43-51.
- Mackay, F., y Leung, H. (2006). The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18, 284-289.
- Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., y Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231-264.

Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., y Browning, J.L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190, 1697-1710.

MacLennan, I.C., Toellner, K.M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M., Zuniga, E., Cook, M.C., y Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194, 8-18.

Mantchev, G.T., Cortesao, C.S., Rebrovich, M., Cascalho, M., y Bram, R.J. (2007). TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J Immunol* 179, 2282-2288.

Martin, F., y Chan, A.C. (2004). Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 20, 517-527.

Martin, F., y Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323-335.

Martin, F., Oliver, A.M., y Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617-629.

Masuda, K., Wang, J., y Watanabe, T. (1997). Reduced susceptibility to Fas-mediated apoptosis in B-1 cells. *Eur J Immunol* 27, 449-455.

Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., y Londei, M. (2003). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 197, 489-501.

McGaha, T.L., Sorrentino, B., y Ravetch, J.V. (2005). Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science* 307, 590-593.

McMaster, P.D., y Hudack, S.S. (1935). The Formation of Agglutinins within Lymph Nodes. *J Exp Med* 61, 783-805.

Mercolino, T.J., Arnold, L.W., Hawkins, L.A., y Haughton, G. (1988). Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med* 168, 687-698.

Merino, M.C., Montes, C.L., Acosta-Rodriguez, E.V., Bermejo, D.A., Amezcua-Vesely, M.C., y Gruppi, A. (2010). Peritoneum from *Trypanosoma cruzi*-infected mice is a homing site of Syndecan-1 neg plasma cells which mainly provide non-parasite-specific antibodies. *Int Immunol* 22, 399-410.

Miller, D.J., y Hayes, C.E. (1991). Phenotypic and genetic characterization of a unique B lymphocyte deficiency in strain A/WySnJ mice. *Eur J Immunol* 21, 1123-1130.

Mizuno, T., Zhong, X., y Rothstein, T.L. (2003). Fas-induced apoptosis in B cells. *Apoptosis* 8, 451-460.

- Mohan, C., Morel, L., Yang, P., y Wakeland, E.K. (1998). Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. *Arthritis Rheum* 41, 1652-1662.
- Mond, J.J., Lees, A., y Snapper, C.M. (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 13, 655-692.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., y Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 7, 293-301.
- Moon, B.G., Takaki, S., Miyake, K., y Takatsu, K. (2004). The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol* 172, 6020-6029.
- Morris, D.L., y Rothstein, T.L. (1993). Abnormal transcription factor induction through the surface immunoglobulin M receptor of B-1 lymphocytes. *J Exp Med* 177, 857-861.
- Murakami, M., Tsubata, T., Okamoto, M., Shimizu, A., Kumagai, S., Imura, H., y Honjo, T. (1992). Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* 357, 77-80.
- Nagata, S., y Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nakamura, A., Yuasa, T., Ujike, A., Ono, M., Nukiwa, T., Ravetch, J.V., y Takai, T. (2000). Fcγ receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J Exp Med* 191, 899-906.
- Navarra, S.V., Guzman, R.M., Gallacher, A.E., Hall, S., Levy, R.A., Jimenez, R.E., Li, E.K., Thomas, M., Kim, H.Y., Leon, M.G., y *col.* Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 377, 721-731.
- Ng, L.G., Ng, C.H., Woehl, B., Sutherland, A.P., Huo, J., Xu, S., Mackay, F., y Lam, K.P. (2006). BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *Eur J Immunol* 36, 1837-1846.
- Nowak, M., Kopp, F., Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X., y Gleichmann, E. (2006). Oral nickel tolerance: Fas ligand-expressing invariant NK T cells promote tolerance induction by eliciting apoptotic death of antigen-carrying, effete B cells. *J Immunol* 176, 4581-4589.
- O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., y Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-98.

O'Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., y Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 22, 711-717.

Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., y Zinkernagel, R.M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286, 2156-2159.

Paciorkowski, N., Porte, P., Shultz, L.D., y Rajan, T.V. (2000). B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *J Exp Med* 191, 731-736.

Pao, L.I., Lam, K.P., Henderson, J.M., Kutok, J.L., Alimzhanov, M., Nitschke, L., Thomas, M.L., Neel, B.G., y Rajewsky, K. (2007). B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase *Shp1* promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity* 27, 35-48.

Pearse, R.N., Kawabe, T., Bolland, S., Guinamard, R., Kurosaki, T., y Ravetch, J.V. (1999). SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity* 10, 753-760.

Pillai, S., Cariappa, A., y Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23, 161-196.

Piris, M.A., Mollejo, M., Campo, E., Menarguez, J., Flores, T., y Isaacson, P.G. (1998). A marginal zone pattern may be found in different varieties of non-Hodgkin's lymphoma: the morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology* 33, 230-239.

Racine, R., y Winslow, G.M. (2009). IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol Lett* 125, 79-85.

Ramesh, N., Morio, T., Fuleihan, R., Worm, M., Horner, A., Tsitsikov, E., Castigli, E., y Geha, R.S. (1995). CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGM1). *Clin Immunol Immunopathol* 76, S208-213.

Rangel-Moreno, J., Moyron-Quiroz, J.E., Carragher, D.M., Kusser, K., Hartson, L., Moquin, A., y Randall, T.D. (2009). Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 30, 731-743.

Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M., y Goodnow, C.C. (1995). CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 376, 181-184.

Rathmell, J.C., y Goodnow, C.C. (1995). Autoimmunity. The Fas track. *Curr Biol* 5, 1218-1221.

Ravetch, J.V. (1994). Fc receptors: rubor redux. *Cell* 78, 553-560.

Ricci, J.E., Gottlieb, R.A., y Green, D.R. (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160, 65-75.

Rudge, E.U., Cutler, A.J., Pritchard, N.R., y Smith, K.G. (2002). Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc gamma RII-mediated B cell suppression. *J Exp Med* 195, 1079-1085.

Sapozhnikov, A., Pewzner-Jung, Y., Kalchenko, V., Krauthgamer, R., Shachar, I., y Jung, S. (2008). Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat Immunol* 9, 388-395.

Sato, S., Ono, N., Steeber, D.A., Pisetsky, D.S., y Tedder, T.F. (1996). CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol* 157, 4371-4378.

Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., y Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111-2114.

Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., y col. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189, 1747-1756.

Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C., y Bondada, S. (1999). Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 29, 3319-3328.

Sen, G., Wu, H.J., Bikah, G., Venkataraman, C., Robertson, D.A., Snow, E.C., y Bondada, S. (2002). Defective CD19-dependent signaling in B-1a and B-1b B lymphocyte subpopulations. *Mol Immunol* 39, 57-68.

Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V.M., Tumas, D., y Grewal, I.S. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity* 18, 279-288.

Shaw, P.X., Horkko, S., Chang, M.K., Curtiss, L.K., Palinski, W., Silverman, G.J., y Witztum, J.L. (2000). Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 105, 1731-1740.

Shu, H.B., Hu, W.H., y Johnson, H. (1999). TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol* 65, 680-683.

Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M.E., Ng, L.G., MacKay, F., Rao, S.P., Kalled, S.L., y Scott, M.L. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family acts

through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* *173*, 2331-2341.

Smith, K.G., y Clatworthy, M.R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* *10*, 328-343.

Stohl, W., Scholz, J.L., y Cancro, M.P. Targeting BLYS in rheumatic disease: the sometimes-bumpy road from bench to bedside. *Curr Opin Rheumatol* *23*, 305-310.

Su, T.T., y Rawlings, D.J. (2002). Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol* *168*, 2101-2110.

Szczepanik, M., Akahira-Azuma, M., Bryniarski, K., Tsuji, R.F., Kawikova, I., Ptak, W., Kiener, C., Campos, R.A., y Askenase, P.W. (2003). B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* *171*, 6225-6235.

Takahashi, Y., Ohta, H., y Takemori, T. (2001). Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* *14*, 181-192.

Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., y Brink, R. (2004). Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* *20*, 785-798.

Thompson, J.S., Bixler, S.A., Qian, F., Vora, K., Scott, M.L., Cachero, T.G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I.D., Mullen, C., y col. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* *293*, 2108-2111.

Tornberg, U.C., y Holmberg, D. (1995). B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique VHDJH repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. *EMBO J* *14*, 1680-1689.

Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4354.

Tumang, J.R., Frances, R., Yeo, S.G., y Rothstein, T.L. (2005). Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol* *174*, 3173-3177.

Ursini-Siegel, J., Zhang, W., Altmeyer, A., Hatada, E.N., Do, R.K., Yagita, H., y Chen-Kiang, S. (2002). TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J Immunol* *169*, 5505-5513.

Vink, A., Warnier, G., Brombacher, F., y Renauld, J.C. (1999). Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population. *J Exp Med* *189*, 1413-1423.

- Watanabe, N., Ikuta, K., Nisitani, S., Chiba, T., y Honjo, T. (2002). Activation and differentiation of autoreactive B-1 cells by interleukin 10 induce autoimmune hemolytic anemia in Fas-deficient antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med* *196*, 141-146.
- Whyburn, L.R., Halcomb, K.E., Contreras, C.M., Lowell, C.A., Witte, O.N., y Satterthwaite, A.B. (2003). Reduced dosage of Bruton's tyrosine kinase uncouples B cell hyperresponsiveness from autoimmunity in lyn^{-/-} mice. *J Immunol* *171*, 1850-1858.
- Williams, R., y White, H. (1986). The greater omentum: its applicability to cancer surgery and cancer therapy. *Curr Probl Surg* *23*, 789-865.
- Wolniak, K.L., Shinall, S.M., y Waldschmidt, T.J. (2004). The germinal center response. *Crit Rev Immunol* *24*, 39-65.
- Xiang, Z., Cutler, A.J., Brownlie, R.J., Fairfax, K., Lawlor, K.E., Severinson, E., Walker, E.U., Manz, R.A., Tarlinton, D.M., y Smith, K.G. (2007). FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* *8*, 419-429.
- Yan, M., Brady, J.R., Chan, B., Lee, W.P., Hsu, B., Harless, S., Cancro, M., Grewal, I.S., y Dixit, V.M. (2001). Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* *11*, 1547-1552.
- Yuasa, T., Kubo, S., Yoshino, T., Ujike, A., Matsumura, K., Ono, M., Ravetch, J.V., y Takai, T. (1999). Deletion of fcγ receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J Exp Med* *189*, 187-194.
- Zhong, X., y Rothstein, T.L. (2011). L2pB1: a new player in autoimmunity. *Mol Immunol* *48*, 1292-1300.
- Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C., y Rothstein, T.L. (2007). PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol* *37*, 2405-2410.
- Zhou, Z.H., Zhang, Y., Hu, Y.F., Wahl, L.M., Cisar, J.O., y Notkins, A.L. (2007). The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe* *1*, 51-61.
- Zuniga, E., Motran, C.C., Montes, C.L., Yagita, H., y Gruppi, A. (2002). Trypanosoma cruzi infection selectively renders parasite-specific IgG⁺ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J Immunol* *168*, 3965-3973.