



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

T E S I S

**SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN RATONES QUE
DESARROLLAN UNA ENFERMEDAD PARECIDA AL LUPUS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

ALICIA NOEMI ARÁMBULA FUENTES

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA

ASESOR INTERNO

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Bajo la Dirección de la Dra. Adriana Karina Chávez Rueda

Esta Investigación fue financiada por CONACYT (49798) y el Fondo para el Fomento de la Investigación Médica (FOFOI) IMSS (2006/1AI/003)

Agradecimientos.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría Centro Medico Nacional Siglo XXI.

En especial a mi directora de tesis, Dra A. Karina Chávez Rueda, por compartir su conocimiento conmigo, por todo su apoyo y tiempo brindado, por su paciencia y por darme una excelente asesoría.

Al Dr. Francisco Blanco por permitirme colaborar en su laboratorio, por todas sus valiosas aportaciones y opiniones.

M. en C. Yadira Ledesma, M. en C. Vicky Legorreta y a M. en C. Luis, e Irais por su disposición y ayuda brindada

A mis padres Manuel y Alicia por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su comprensión, confianza y por el apoyo incondicional que me dieron a lo largo de la carrera gracias por todo.

A mis maestros Dr. Ruben Marroquín, QFB Paty Vidal, Mtra Yolanda Flores, que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

A mi sinodal M. en C. Araceli García por sus valiosas observaciones y sugerencias.

Esta tesis esta dedicada:

Principalmente a mis padres que en todo momento han estado conmigo y porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional. En todo momento los llevo conmigo

A toda mi familia en especial a mis hermanos Israel, Belén, Agueda a mi sobrino Rodrigo, y a mi cuñado Memo por la compañía y el apoyo que me brindan, se que cuento con ellos siempre.

A Antonio por ser la persona que comparte el tiempo a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas.

A todos mis amigos por el apoyo y motivación que he recibido.

ÍNDICE.	Pág.
ABREVIATURA.....	1
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
DIAGRAMA DE FLUJO	16
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIÓN.....	29
GLOSARIO	30
ANEXO.....	32
REFERENCIAS.....	34

ABREVIATURAS.

BCR	Receptor de linfocito B
CD	Molécula de diferenciación
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas
FACS	Análisis de fluorescencia de células
FO	Linfocito B Folicular
IFNγ	Interferón gamma
Ig's	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
Lpr	Linfoproliferación
MZ	Linfocito B de Zona Marginal
PALS	Bolsa linfoide periarterial
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Ribonucleo proteína
SFB	Suero fetal de bovino
T1	Linfocito B Transitorio-1
T2	Linfocito B Transitorio-2
T3	Linfocito B Transitorio-3
Th1	Linfocito T cooperador 1
Th2	Linfocito T cooperador 2

ANTECEDENTES.

El proceso de maduración del linfocito B (ontogenia) inicia en médula ósea donde las células precursoras pasan por diferentes etapas, las cuales se diferencian por un patrón específico de expresión de genes de Inmunoglobulinas (Ig's.) y proteínas de superficie que sirven como marcadores fenotípicos de estos estadios de maduración. Los acontecimientos principales son el reordenamiento y la expresión de los genes de Ig's en un orden preciso, la proliferación de linfocitos inmaduros y la selección negativa.⁽¹⁾

El primer estadio es linfocito pro-B, es la célula más precoz ya diferenciada hacia la estirpe B de médula ósea, la cual presenta la primera recombinación de genes Ig's en la cadena pesada y presenta marcadores de superficie CD19 CD38 y CD10. Posteriormente pasa al estadio pre-B el cual sintetiza la cadena pesada citoplásmica μ que se une a la cadena ligera subrogada (idéntica en todos los linfocitos) formando el complejo receptor de linfocitos pre-B y comienza el reordenamiento de genes de la cadena ligera, la unión de la cadena ligera con μ forman la molécula IgM que se expresa en la superficie del linfocito B inmaduro (IgM⁺), en esta etapa el linfocito migra hacia bazo,⁽²⁻⁷⁾ donde termina su proceso de maduración (Figura 1).

Para diferenciar a los linfocitos B inmaduros que se encuentran en médula ósea de los que viajan hacia bazo se ha utilizado el término de linfocitos B transitorio (T). Allman y Colleman sugieren que en bazo existen tres tipos de poblaciones de linfocitos B inmaduros: Transitorios-1 (T1), Transitorios-2 (T2) y Transitorios-3 (T3). Los linfocitos B T1 presentan el fenotipo B220⁺ AA4⁺ CD23⁻ IgM^{high}, el T2 B220⁺ AA4⁺ CD23⁺ IgM^{high} y el T3 B220⁺ AA4⁺ CD23⁺ IgML^{ow}.^(3,4) (Tabla 1 y Figura 2).

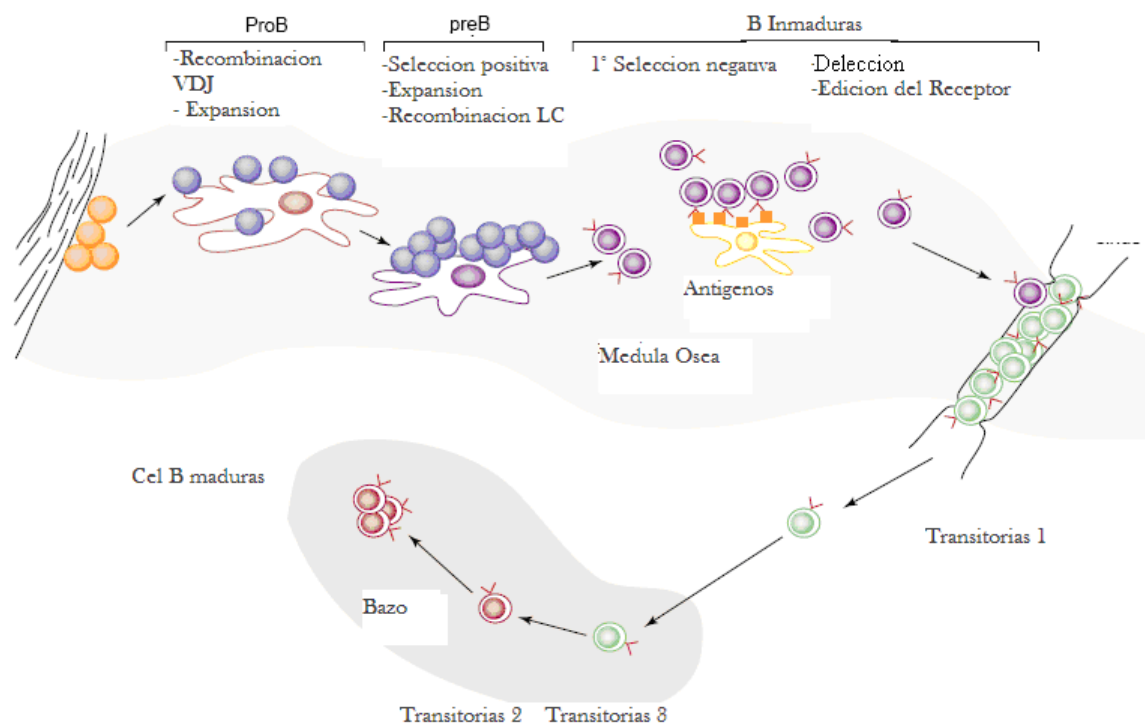


Figura 1. Estadio de maduración del linfocito B. ⁽⁵⁾

	Inmaduras	T1	T2	T3	Maduras
SigM	+++	+++	+++	++	++
SigD	—	—	++	++	+++
CD21	—	—	++	++	++
CD23	—	—	++	++	++
HAS	+++	+++	+++	+++	+
493	+	+	+	Un	—
AA4	+	+	+	+	—
CD62L	un	—	—	+	un
RAG	+	±	±	Un	—
Localización anatómica	Medula Ósea	Bazo	Bazo	Bazo Ganglio linfático	

Tabla1. Expresión de los marcadores de superficie de linfocitos B inmaduros y transitorios⁽⁵⁾

Abreviación: **T1** Transitoria 1, **T2** Transitoria 2, **T3** Transitoria 3; **un** desconocido
 + Representa el nivel de expresión positiva, - Representa el nivel de expresión negativa

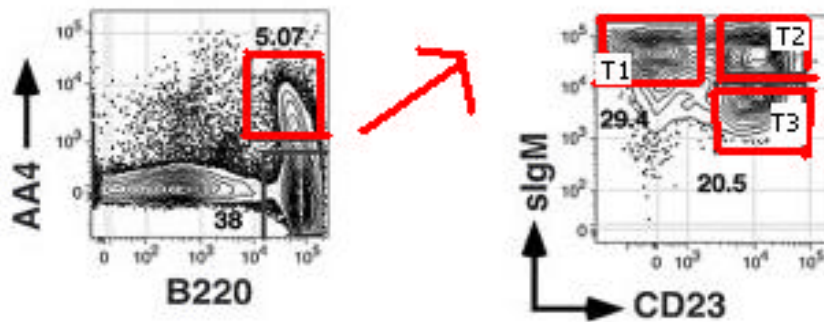


Figura 2. Subpoblaciones de linfocitos B en bazo por citometría de flujo. Los linfocitos B T1 presentan el fenotipo B220+ AA4+ CD23⁻ IgM^{high}, el T2 AA4⁺ CD23⁺ IgM^{high} y el T3 AA4⁺ CD23⁺ IgM^{low} (3)

Los linfocitos B T1 migran de médula ósea hacia bazo, donde se sitúan principalmente en el exterior de la bolsa linfoide periarterial (PALS) y posteriormente se diferencian hacia linfocitos B T2 y T3 que se encuentran localizados dentro de los folículos primarios. (5) Existen diferencias funcionales entre los linfocitos B transitorios y maduros; la unión del receptor de linfocitos B (BCR) a su antígeno induce al linfocito B maduro a que se active y entre al ciclo celular, mientras que el transitorio se va a apoptosis (muerte celular programada) (1)

En bazo existen tres distintas poblaciones de linfocitos B maduros: Los linfocitos B Foliculares “FO” que residen en los folículos linfoides primarios y presentan el siguiente fenotipo CD21^{int} CD23^{high} CD24^{low} IgML^{ow} IgD^{high}, los linfocitos B de la Zona Marginal “MZ” (región que se encuentra entre la pulpa blanca y pulpa roja del bazo) y que son del fenotipo CD21^{high} CD23^{neg} CD24^{high} IgM^{high} IgDL^{ow} (6) y los linfocitos B1 (CD5⁺) que se encuentran principalmente en el peritoneo y cavidad pleural, la proporción de estos linfocitos en bazo es muy pequeña en comparación de los linfocitos B FO y MZ(4) . (Figura 3)

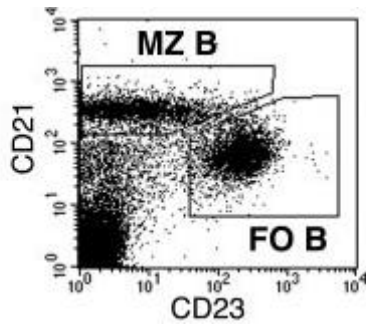


Figura 3. Linfocitos B maduros de bazo de ratón por citometría de flujo. Los linfocitos B MZ presentan expresión de $CD21^{high}$, $CD23^{low}$, mientras que los FO expresan $CD21^{inter}$, $CD23^{high}$. (4)

Los linfocitos B FO también conocidos como linfocitos B “naive” ó linfocitos B convencionales participan en la formación de los centros germinales, cuando proliferan por el reconocimiento del antígeno y de moléculas coestimuladoras.

Los linfocitos T activados secretan citocinas que se unen a sus receptores, también situados en la superficie de los linfocitos B. La combinación de estas señales estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células secretoras de anticuerpo e inducen un cambio de isotipo. (1,7,8). La maduración de la afinidad de los anticuerpos (hipermutación somática) y la generación de linfocitos B de memoria también tiene lugar en los centros germinales; los linfocitos B que intervienen en la formación de los centros germinales también intervienen en la respuesta inmune adaptativa caracterizada por la producción de anticuerpos antígeno específico de alta afinidad y cambio de isotipo. En contraste, a los linfocitos B FO, los linfocitos B MZ y B-1 son responsables de la rápida producción de anticuerpo IgM. Los linfocitos B MZ son la principal fuente de auto-anticuerpos de baja afinidad (anticuerpos naturales) (7).

Basadas en sus distintas funciones fisiológicas recientemente se ha sugerido que los linfocitos B maduros de bazo se pueden agrupar en dos distintas categorías: (a) Los linfocitos B que intervienen en la repuesta inmune adaptativa (linfocitos B FO) y (b) los linfocitos B que intervienen en la respuesta inmune innata (linfocitos B MZ y B-1) (7).

Se ha estimado que la médula ósea produce aproximadamente 2×10^7 linfocitos B (IgM + BCR+) por día, pero solamente el 10% de estas células llegan a bazo y del 1-3% maduran, significando que aproximadamente el 90% de los linfocitos B producidos por día mueren antes de dejar médula ósea. Esta eliminación de linfocitos B es atribuida a la selección negativa que sufre el linfocito en médula ósea durante su maduración y donde se eliminan los linfocitos inmaduros que reconoce antígenos propios a través de su receptor BCR, la selección negativa (parcialmente responsable del mantenimiento de la tolerancia) se lleva a cabo por tres distintos mecanismos: edición de receptor, apoptosis y anergia. ^(1,7,8).

El proceso de activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B ocurre en los órganos linfoides secundarios. La activación se inicia tras el reconocimiento del antígeno por el BCR del linfocito y consta de una serie de pasos que provocan su proliferación (expansión de clones específicas al antígeno), diferenciación a linfocitos B de memoria de vida larga y a células secretoras de anticuerpos (células plasmáticas), algunas de las cuales continúan produciendo anticuerpos (los anticuerpos neutralizan patógenos y toxinas facilitando la opsonización y la activación del complemento) durante periodos prolongados ^(1,7,8).

La función del linfocitos B en la respuesta inmune va más allá de ser el precursor de la célula plasmática además tiene la capacidad de presentar antígeno, regular la activación del linfocitos T, secretar citocinas y polarizar la respuesta del linfocitos T hacia Th1 o Th2. ^(9,10) La desregulación de alguna de estas funciones puede resultar en una respuesta inmune aberrante que rompa la tolerancia y contribuya al desarrollo de auto inmunidad y/o enfermedad auto inmune.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por presentar una desregulación de la respuesta inmune, entre estos se encuentra el lupus eritematoso sistémico (LES) el cual se considera el prototipo de la enfermedad sistémica autoinmune, es de etiología desconocida y puede afectar cualquier

órgano o sistema del organismo. Afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva con una relación mujer/hombre de 10:1

Se caracteriza primordialmente por defectos en la tolerancia y homeostasis (10,11) y la presencia de auto-anticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares como DNA, RNA, RNP, Ro e histonas; los cuales pueden formar complejos inmunes, que con frecuencia se depositan en riñón, piel, cerebro y otros tejidos causando inflamación y daño tisular.(10,12)

Además se ha documentado que hay anomalías significativas en la homeostasis de linfocito B y puede ser reflejada en la pérdida de la tolerancia de células B y activación de linfocitos B aberrantes, (11) los cuales participan en el LES a) como precursores de células secretoras de auto-anticuerpos (los auto-anticuerpos contribuyen a múltiples mecanismos de autoinmunidad, incluyendo hipersensibilidad de tipo III mediada por complejos inmunes, (11,13) b) presentando auto antígenos a las células T, y c) ayudan a la regulación de la respuesta inflamatoria, secretando citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN γ , linfotoxina- α) (13).

Se han utilizado modelos murinos para estudiar la fisiopatología de lupus eritematoso sistémico como las diferentes cepas NZBxNZW F₁, BXSB, MRL/MpJ y MRL/MpJ-Fas^{lpr} que presentan una enfermedad similar a LES (14,15). Los ratones que son propensos a sufrir lupus desarrollan una enfermedad renal la cual es letal y es causada por el depósito de complejos inmunes, dependiendo de la cepa varían los patrones y la gravedad de la enfermedad. (14)

La cepa MRL/MpJ proviene de una cruce de ratones C57/BL6J, C3H/HeDi, AKR/J y LG/J, durante la cual se presentó una mutación espontánea del gen Fas en la 12^a generación obteniéndose así la cepa MRL/MpJ-Fas^{lpr} (MRL/lpr) (16,17) (El significado de lpr es linfoproliferación). La interacción de Fas y su ligando (FasL) se requiere para la iniciación de apoptosis dentro de la activación de linfocitos B y T (18). Clínicamente presentan depósitos de complejos inmunes, vasculitis, esplenomegalia, hipergamaglobulemia,

producción de anticuerpos anti-nucleares principalmente aquellos dirigidos contra DNA y glomérulo nefritis que a menudo es la causa de muerte temprana (50% en 6 meses para la cepa MRL/lpr y 50% en 17 meses para la cepa MRL/MpJ).⁽¹⁶⁾ Como características histológicas presentan una aguda proliferación de células endoteliales y sinoviales con una destrucción de cartílago articular, usualmente detectado microscópicamente; una hiperplasia masiva de todos los órganos linfoides, algunas veces con hemorragia y necrosis quística. Como anomalías inmunes, presentan hiperplasia linfoide, que es el primer resultado de la expansión inusual de células con fenotipo CD3+ CD4- CD8- B220+, hiperactivación de células B que aparecen justo antes de la aparición clínica de la enfermedad. Además niveles altos de inmunoglobulinas IgM e IgG y macrófagos con una baja secreción de IL-1 β ^(14,19)

Algunas características que se encontraron en MRL/lpr y nunca, o raramente en otras cepas como la NZB y sus híbridos son: una masiva linfoproliferación, factor reumatoide IgM, una inflamación erosiva de poliartritis⁽¹⁴⁾; desarrollo de una nefritis fatal. Además de desarrollar una infiltración linfocítica de glándulas salivales, páncreas, músculos periféricos.^(14,20)

Esta cepa ha servido para demostrar la importancia de los linfocitos B en el desarrollo de lupus. Los ratones MRL/lpr deficientes de linfocitos B ("Knock out" para el locus J de la cadena pesada de las Ig's) muestran una enfermedad menos agresiva (disminución de glomerulonefritis, vasculitis, activación y expansión de linfocitos T autoreactivos), en comparación con los ratones que presentan linfocitos B (cepa silvestre).⁽²¹⁾ Shlomchik y sus colegas utilizaron un enfoque novedoso que demostró la importancia que tienen las distintas funciones del linfocitos B en la patogénesis de lupus y que son independientes a la producción de autoanticuerpos, utilizando ratones transgénicos de la cepa MRL/lpr que no pueden secretar anticuerpos, observaron que ha diferencia de los que no tienen linfocitos B estos siguen presentando glomerulonefritis y vasculitis al igual que la cepa silvestre.^(11,22)

Basado en lo anterior nos parece interesante determinar si alguna subpoblación de linfocito B se incrementa cuando se exagera la enfermedad

con la edad en ratones MRL/lpr y comparar estas subpoblaciones de linfocitos B provenientes de ratones que no desarrollan lupus (C57BL/6).

JUSTIFICACIÓN.

Para estudiar la enfermedad se han utilizado modelos murinos que espontáneamente desarrollan una enfermedad similar a lupus. En ellos se ha demostrado la importancia que tiene el linfocito B. Sin embargo, existe poca evidencia de la participación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B en el desarrollo de lupus por lo que nos parece interesante relacionar estas subpoblaciones con la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El proceso de maduración del linfocito B inicia en la médula ósea, donde la última etapa es como linfocito B inmaduro, el cual deja la médula ósea y viaja hacia bazo como linfocito B transitorio -1 (T1). El linfocito B T1 llega a bazo donde se diferencia hacia linfocito B T2 y T3. La activación de los linfocitos transitorios por diferentes señales permite una diferenciación hacia linfocito B maduros (FO y MZ). En la respuesta inmune el linfocito B tiene diferentes funciones como: presentar antígeno, secretar citocinas y polarizar la respuesta del linfocito T hacia Th1 o Th2, entre otras. La desregulación de alguna de estas funciones puede resultar en una respuesta inmune aberrante que rompa la tolerancia y contribuya al desarrollo de autoinmunidad.

El LES se caracteriza por anomalías tanto en los linfocitos B como T.

Se han utilizado modelos murinos, como la cepa MRL/lpr que espontáneamente desarrolla una enfermedad parecida al lupus, con las siguientes manifestaciones: depósitos de complejos inmunes, glomeronefritis, vasculitis, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia y producción de anticuerpos anti-nucleares, principalmente anticuerpos dirigidos contra DNA.

Se sabe que los linfocitos B juegan un papel importante en la aparición del lupus. Sin embargo, aun no se sabe si alguna subpoblación de los linfocitos B pudiera tener alguna participación relevante en la enfermedad. Por lo que tratamos de contestar la siguiente pregunta.

¿Alguna de las distintas subpoblaciones de linfocito B incrementan al exacerbarse la enfermedad?

HIPÓTESIS.

- Existe un incremento en algunas de las subpoblaciones de linfocitos B transitorios cuando aumentan las manifestaciones de lupus.

OBJETIVOS.

GENERAL.

- Determinar el número absoluto de linfocitos B y sus distintas subpoblaciones en ratones MRL/lpr y en C57BL/6 a distintas edades.

PARTICULARES.

- Determinar la actividad de lupus (proteinuria y anticuerpos anti-DNA) en ratones MRL/lpr a distintas edades (9 y 20 semanas)
- Determinar el número absoluto de linfocitos B en las cepas de ratones C57BL/6 y MRL/lpr a distintas edades (9 y 20 semanas de edad).
- Determinar el número absoluto de las distintas subpoblaciones de linfocitos B en las cepas de ratones C57BL/6 y MRL/lpr a distintas edades (9 y 20 semanas de edad).

MATERIAL Y MÉTODOS.

ANTICUERPOS.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti CD21-FITC (7G6), anti AA4-PE (AA4.1), CD23-Biotinilado, anti IgM-APC (11/41), anti CD19-Cy7 (1D3), anti B220-biotinilado, anti CD3-APC (145-2c1) de la marca eBioscience, streptavidina-Cy5 de la marca (BDBioscience) .

ANIMALES.

Se utilizaron 5 ratones de 9 semanas y 5 ratones de 20 semanas de edad de la cepa MRL/MpJ Fas^{lpr/J} (Jackson Laboratory) y C57BL/6 (Harlan) provenientes de Estados Unidos. Los cuales se alojaron en cajas de policarbonato de piso sólido con micro aislador. Se les dio alimento esterilizado que contenía no menos de: 18% de proteína cruda, 6% de grasa cruda y no más de 3% de minerales. El agua fue potable y se esterilizó por autoclave. La administración de agua y alimento fue a libre acceso.

Se les proporciono los cuidados y la atención veterinaria especificada en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999

NIVEL DE BIOSEGURIDAD

El nivel de bioseguridad de nuestro experimento fue 1, debido a que se trabajo con material biológico (células de ratones) que no producen enfermedad y no son un riesgo para la salud de personas sanas y el medio ambiente.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINURIA.

Antes de cada experimento se tomó una gota de orina, la cual se colocó en la tira reactiva (Uri-Quick de Stanbio) y se registró el cambio en la banda antes del minuto, las lecturas se reportaron en mg/dL.

OBTENCIÓN DE SUERO DE RATÓN.

Los ratones se anestesiaron en una cámara saturada de éter etílico, se procedió a tomar la muestra de sangre ocular con capilares heparinizados y se recolectó en viales. La sangre obtenida se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min, se separó el suero y se dosificó en viales etiquetados que se almacenaron hasta su uso a -35°C .

ANTICUERPOS Anti-DNA.

La determinación de anticuerpos anti-DNA se realizó por el método de ELISA. La placa se sensibilizó con antígeno (DNA de timo de carnero [SIGMA]) a una concentración de $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, se incubó a 4°C toda la noche y se lavó 2 veces con PBS-Tween. La placa se bloqueó con $200\ \mu\text{L}$ de PBS-BSA-Tween, se incubó a 37°C 1 h y se lavó 2 veces. Se adicionó $100\ \mu\text{L}$ del estándar de anticuerpo anti-DNA (Chemican International) a distintas concentraciones (250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 y $0\ \text{ng}/\text{mL}$) y $100\ \mu\text{L}$ de los sueros problemas diluido 1:50, la placa se incubó a 37°C / 1 h y se lavó 4 veces. Se colocó $100\ \mu\text{L}$ del conjugado (Ig's de conejo anti IgG de ratón unido a fosfatasa alcalina [Zymed-Invitrogen]) se incubó a 37°C 45 min. y se lavó 4 veces. Finalmente se adicionó $100\ \mu\text{L}$ de sustrato para fosfatasa alcalina y se leyó a los 20 min. A $405\ \text{nm}$. en un lector de ELISA (Dynatech MR5000).

INMUNOGLOBULINAS (IgG)

La determinación de anticuerpos IgG totales se realizó por el método de ELISA. La placa se sensibilizó con anticuerpo anti Ig de ratón fracción (Fab)₂ (Biosource), se incubó 4°C toda la noche y se lavó 2 veces con PBS-Tween. La placa se bloqueó con $200\ \mu\text{L}$ de PBS-BSA-Tween, se incubó a 37

°C 1 h y se lavó 2 veces. Se adicionó 100 µL de el estándar (IgG de ratón [Zymed-Invitrogen]) a distintas concentraciones (125, 62.5 , 31.25 , 15.6 , 7.8 y 0 ng/mL) y 100 µL de los sueros problemas diluido 1:40000, la placa se incubó a 37 ° C 1 h y se lavó 6 veces. Se colocaron 100 µL del conjugado (Ig's de conejo anti IgG de ratón unido a fosfatasa alcalina [Zymed-Invitrogen]) se incubó a 37 °C 45 min. y se lavó 5 veces con PBS-Tween y 2 veces con regulador de bicarbonatos; fnalmente se adicionó 100 µL de sustrato para fosfatasa alcalina y se leyó a los 20 min. a 405 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000).

OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO

Los animales se sacrificaron utilizando éter etílico (eutanasia). Se obtuvo el bazo y se colocó en una caja Petri para inyectarle solución salina, enseguida se pasó por un filtro en el cual se maceró con el embolo de una jeringa, se lavó con solución salina y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y a las células se les agregó 1.5 mL del regulador de lisado (SIGMA) durante 1 min. 30 segundos, las células se lavaron con solución salina, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos, las células se resuspendieron en regulador para FACS y se contaron utilizando una cámara de Neubauer.

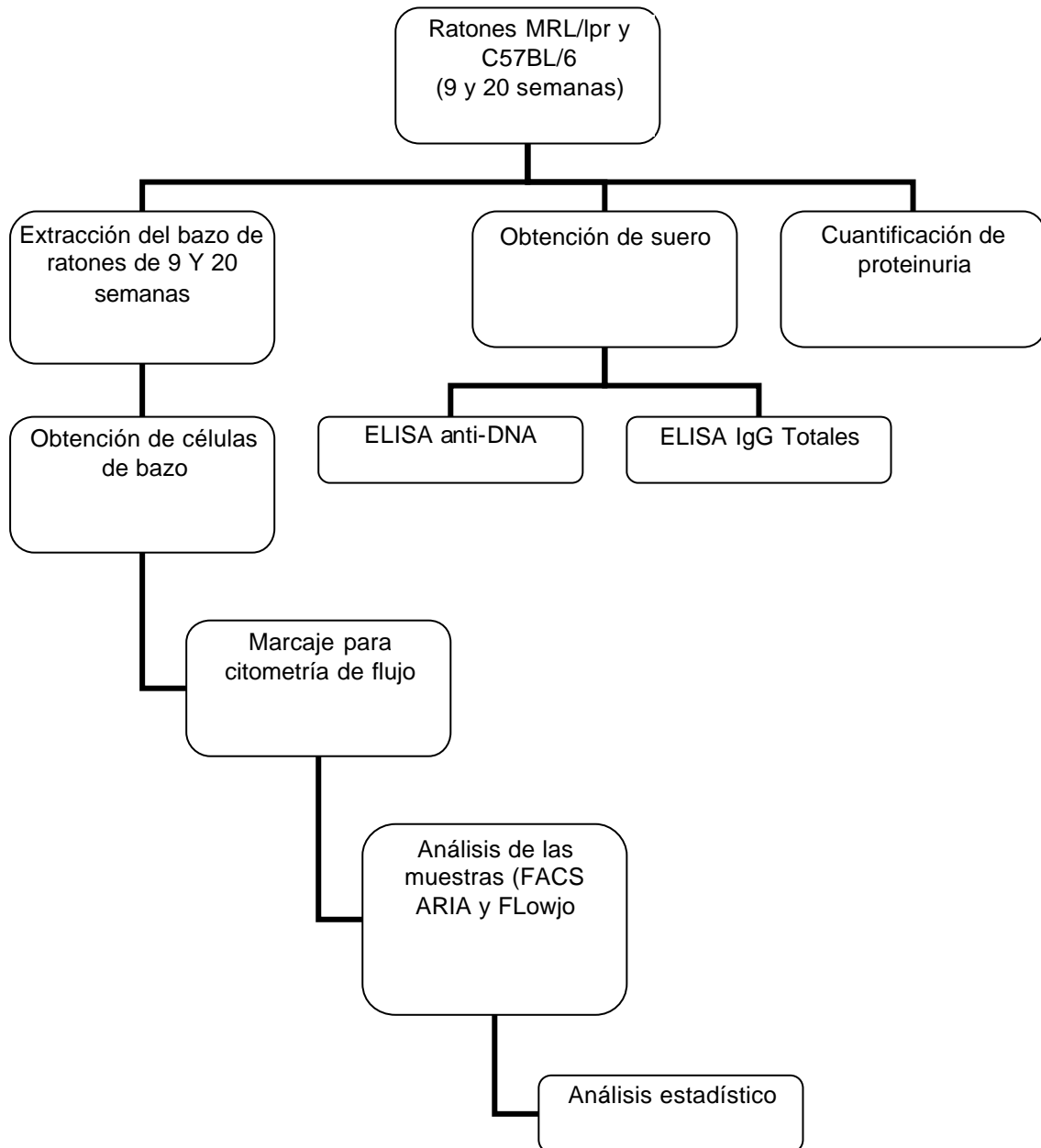
MARCAJE PARA CITOMETRIA DE FLUJO

Se tomaron 500 000 células de cada ratón y se lavaron con regulador FACS, enseguida se colocó 50 µL de anticuerpo anti CD21-FITC, anti AA4-PE, CD23-biotinilado , B220- biotinilado , anti CD3-APC, anti CD19-Cy7, anti IgM-APC, se incubaron a 4° C 20 min. en oscuridad, se lavaron con regulador FACS y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 min, se adicionó streptavidina-Cy5 e incubó a 4° C durante 20 min. en oscuridad, se lavo y fijo las células con paraformaldehído al 2% a 4° C durante 5 min. Las células que se obtuvieron se resuspendieron en 300 µL de regulador FACS. Las muestras se leyeron con el FACS ARIA con el software de BD Biosciences. Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowjo (Tree Star)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se describieron de acuerdo a la distribución de los datos (mediana y percentiles). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba normalidad Shapiro Wilk. Las variables independientes cuantitativas se compararon mediante U de Mann-Withney. Las diferencias entre grupos se determinó utilizando la prueba kruskal-Wallis. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$, el análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de cómputo SPSS 12 para Windows.

DIAGRAMA DE FLUJO.



RESULTADOS.

La determinación de la actividad de lupus en el modelo murino, se realizó midiendo los niveles de proteinuria. En la cepa control (C57BL/6) no se observó proteinuria a las 9 semanas (Me= 0 mg/dL) y 20 semanas de edad (Me=0 mg/dL). En contraste, en la cepa MRL/lpr presentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los niveles de proteinuria a las 20 semanas (Me=200 mg/dL), no así a las 9 semanas (Me=15mg/dL). (Figura 4).

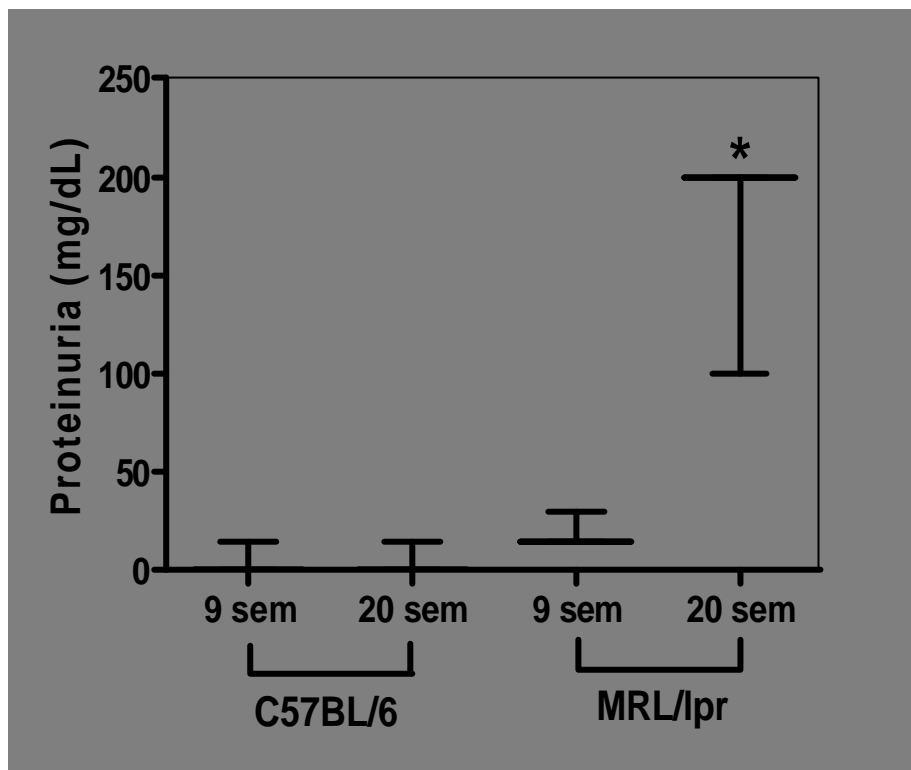


Figura 4. Proteinuria. Los niveles de proteinuria, se cuantificaron tomando una gota de orina la cual se colocó en la tira reactiva y se registró el cambio en la banda antes del minuto. * $p < 0.05$.

Se determinaron los niveles séricos de anticuerpos anti-DNA del isotipo IgG . Las concentraciones de anticuerpos anti-DNA fueron muy bajas tanto en la cepa control a las 9 semanas ($\text{Me}=0 \mu\text{g/mL}$) y 20 semanas ($\text{Me}=1.3 \mu\text{g/mL}$) como en la cepa MRL/lpr a las 9 semanas ($\text{Me}=0.82 \mu\text{g/mL}$). En contraste, los niveles de anticuerpo anti-DNA en la cepa MRL/lpr a las 20 semanas incrementa con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a las antes mencionadas. (Figura 5).

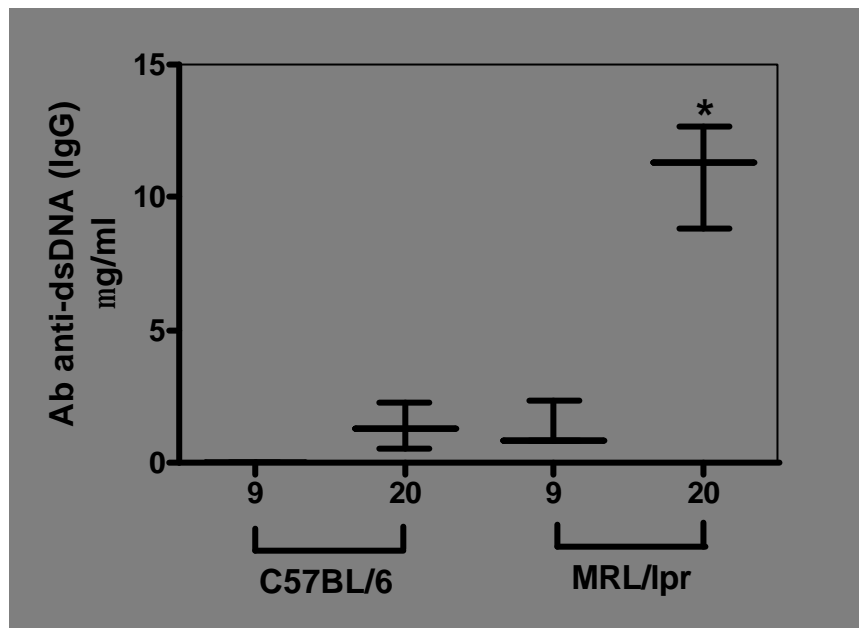


Figura 5. Anticuerpos anti-DNA. Se tomaron sueros de ratón (C57BL/6 y MRL/lpr) a las 9 y 20 semanas de edad, la cuantificación de anticuerpos anti-DNA del isotipo IgG se realizó por el método de ELISA. * $p < 0.05$.

La figura 6 muestra la concentración sérica de inmunoglobulinas totales de la clase IgG . En la cepa control no se encontró una diferencia en los niveles de IgG en las distintas edades (9 semanas $\text{Me}= 801.6 \mu\text{g/mL}$, 20 semanas $\text{Me}= 740.8 \mu\text{g/mL}$), mientras que los niveles a las 9 semanas de la cepa MRL/lpr se encuentra aumentado con una diferencia estadísticamente significativa ($\text{Me}= 2849.6 \mu\text{g/mL}$) con respecto a la cepa control y este incremento casi se ve duplicado a las 20 semanas en la cepa MRL/lpr $\text{Me}= 4720 \mu\text{g/mL}$).

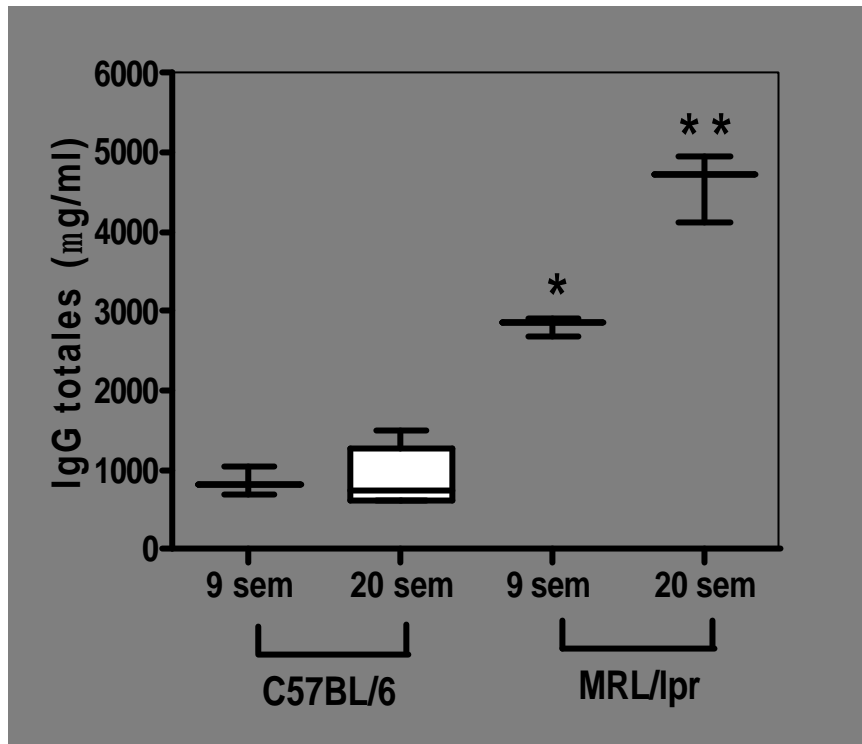


Figura 6. IgG Totales. Se tomaron sueros a las 9 y 20 semanas de edad de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr, la cuantificación de inmunoglobulinas (IgG) totales se realizó por el método de ELISA. *p<0.05. ** p<0.01.

La figura 7 muestra las distintas regiones para determinar el número absoluto de linfocito B y la diferenciación del linfocito B en distintas subpoblaciones: linfocito B maduro: Foliculares (FO) y Zona Marginal (MZ); linfocitos B inmaduros: Transitorios-1 (T1), Transitorios-2 (T2) y Transitorios-3 (T3). El número absoluto de linfocitos B y sus subpoblaciones se obtuvieron utilizando la siguiente formula:

$$\text{Núm. Absoluto} = \frac{\text{Núm. de células en la región problema}}{\text{Núm. de células en la región de células vivas}} \times \text{Núm. de células en bazo}$$

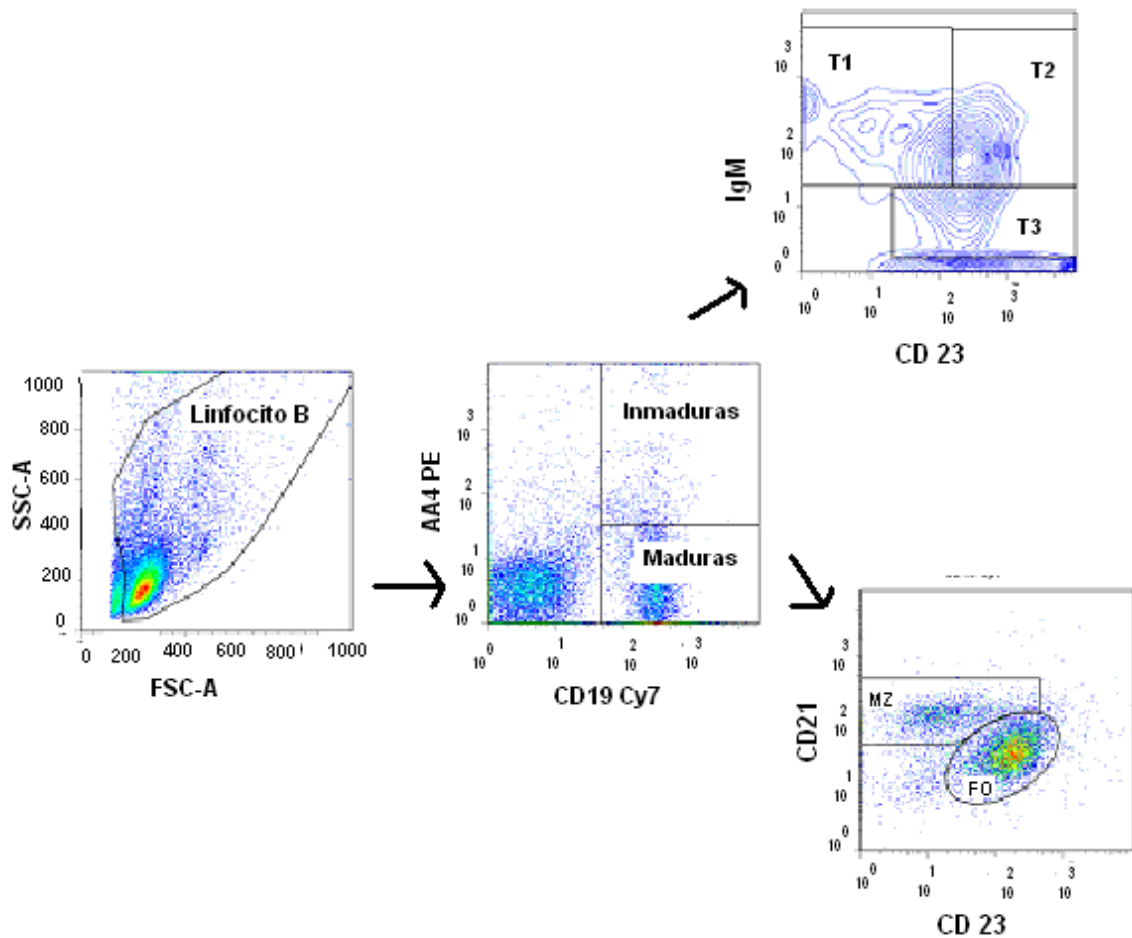


Figura 7. Número absoluto de linfocitos B y Subpoblaciones Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: CD19-Cy7, AA4-PE, CD23-biotinilado, CD21-FITC, IgM-APC a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSAria y analizaron utilizando el programa FlowJo

No encontramos una diferencia estadísticamente significativa en el número absoluto de linfocitos B (CD19+) a las 9 y 20 semanas en ninguna de las dos cepas estudiadas. (Figura 8).

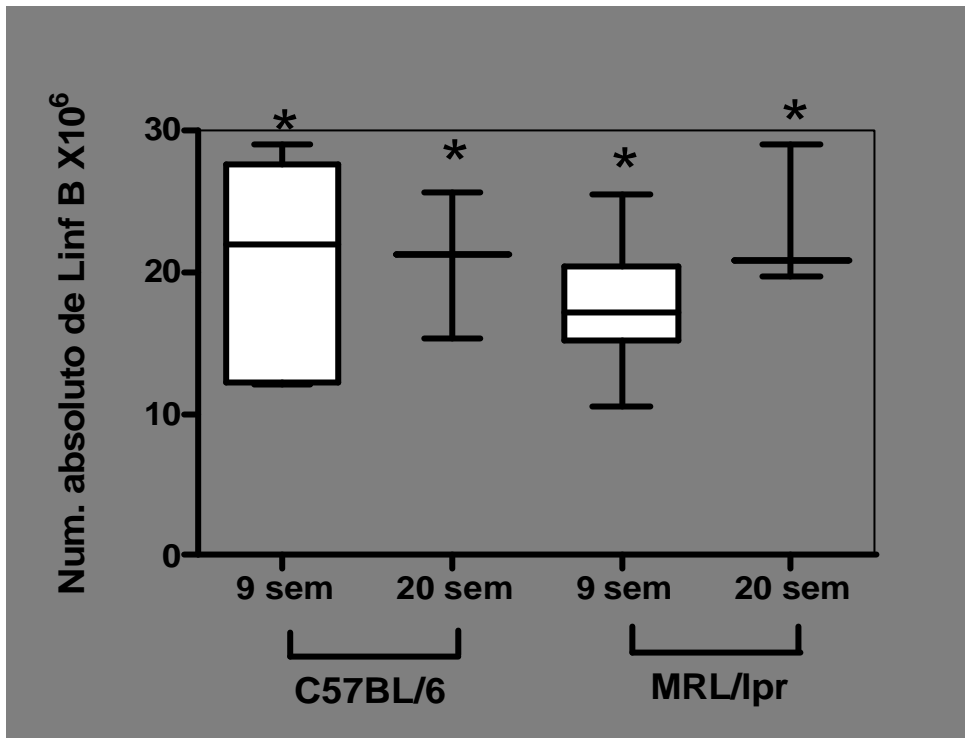


Figura 8. Número absoluto de linfocitos B. Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti CD19-Cy7 a 4 ° C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSAria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * $p > 0.05$

La figuras 9 y 10 muestran el número absoluto de las distintas subpoblaciones de linfocitos B maduros: Foliculares (FO) y Zona Marginal (MZ). En la cepa control no se observó un cambio en el número de linfocitos B de MZ con respecto a la edad (9 semanas $Me = 1.56 \times 10^6$, 20 semanas $Me = 2.5 \times 10^6$). Sin embargo, existe una tendencia a incrementar sin ser estadísticamente significativa el número de linfocitos B FO a las 20 semanas ($Me = 12.26 \times 10^6$) con respecto a las 9 semanas ($Me = 8.18 \times 10^6$). En contraste, en la cepa MRL/lpr no se encontró diferencia en el número de linfocitos B FO a las distintas edades pero si un aumento en el número de linfocitos B MZ a las 9 semanas ($Me = 5.79 \times 10^6$) en comparación de la cepa control y este aumento incrementa con la edad (20 semanas $Me = 8.5 \times 10^6$).

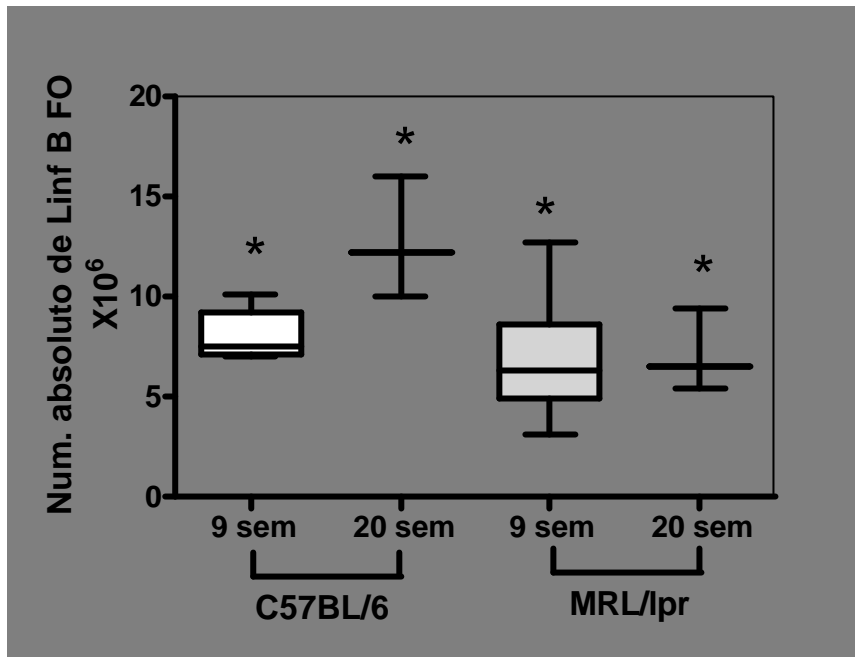


Figura 9. **Número absoluto de linfocitos B FO.** Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: AA4-PE, CD19-Cy7, CD21-FITC, CD23-biotinilado a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSaria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * $p > 0.05$

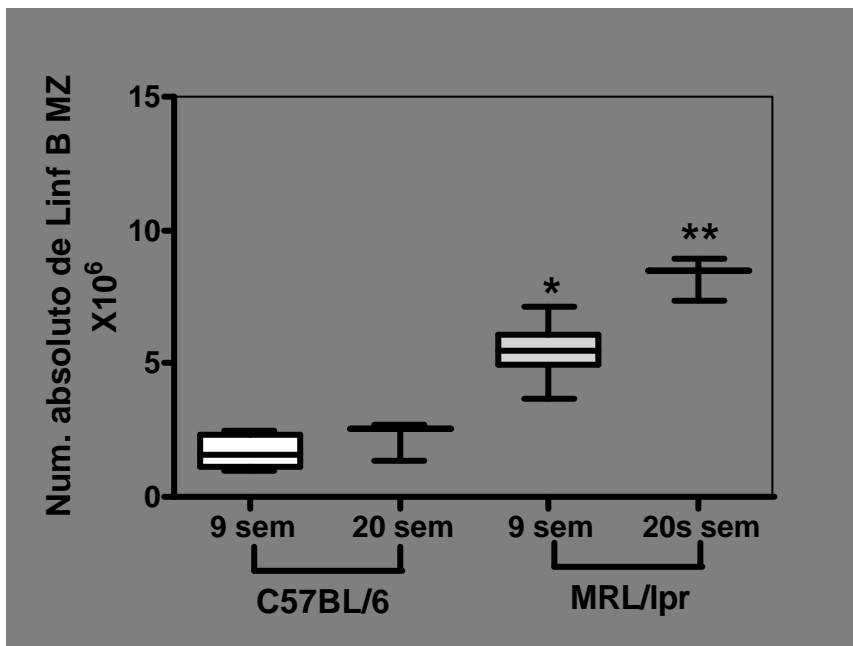


Figura 10. **Número absoluto de linfocitos B MZ.** Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: AA4-PE, CD19-Cy7, CD21-FITC, CD23-biotinilado a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSaria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

En cuanto al número absoluto de linfocitos B inmaduros en bazo (transitorios) no encontramos una diferencia en cuanto a la edad en las distintas cepas. (Figura 11)

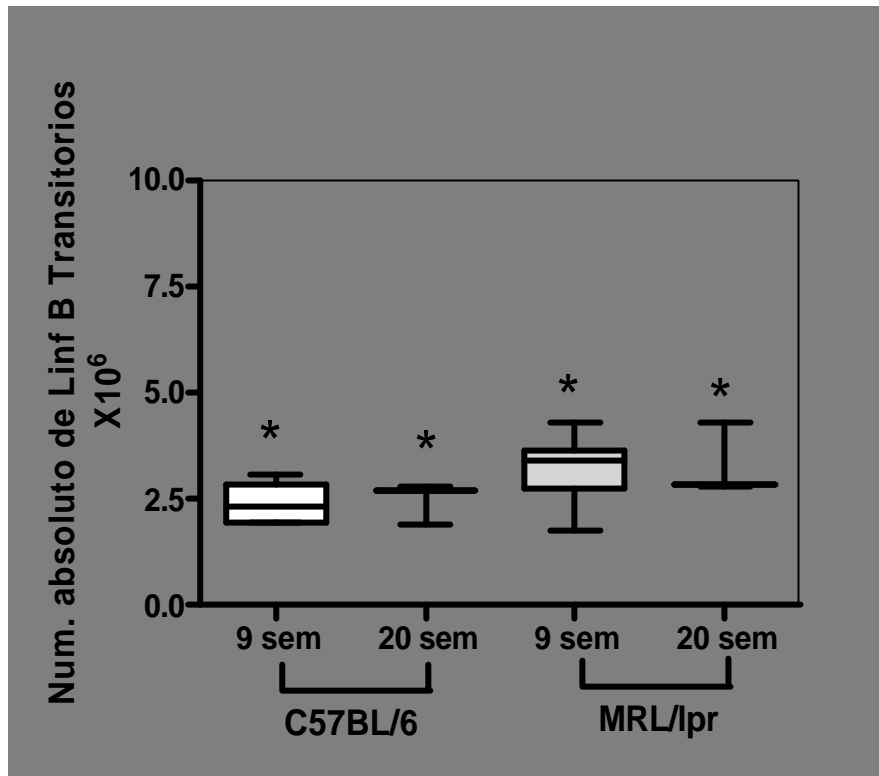


Figura 11. Número absoluto de linfocitos B Transitorios. Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: AA4-PE, CD19-Cy7, IgM APC, CD23 biotinilado a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSAria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * $p > 0.05$

La figura 12 muestra un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el número de linfocitos B T1 en la cepa MRL/lpr a las 20 semanas (Me= 0.9×10^6) con respecto a las 9 semanas (Me= 0.6×10^6) y en la cepa control (9 semanas Me= 0.48×10^6 20 semanas Me= 0.58×10^6). En cuanto a la subpoblación de linfocitos B T2, no se observó diferencias entre las distintas cepas a diferentes edades. (Figura 13)

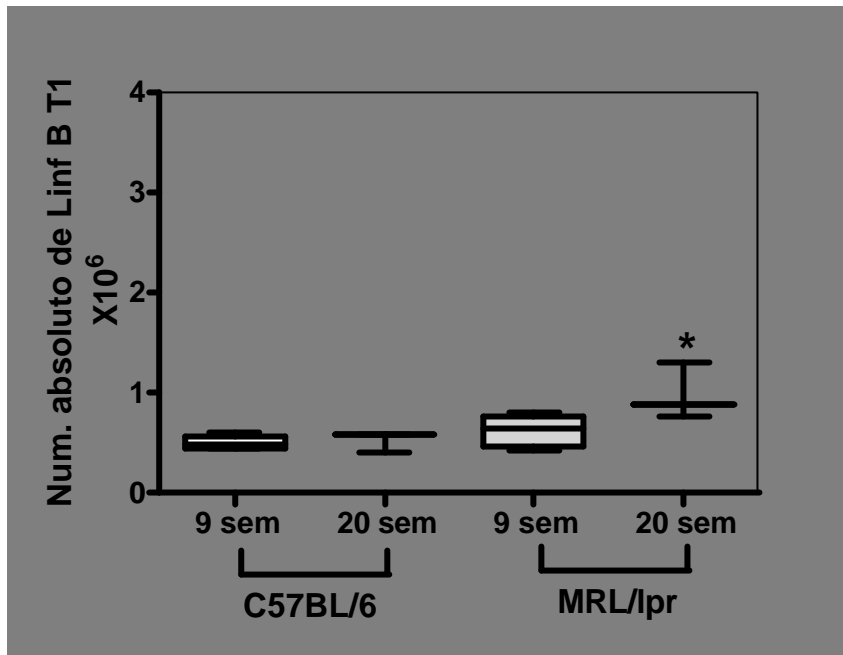


Figura 12. Número absoluto de linfocitos B Transitorios T1. Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: AA4-PE, CD19-Cy7, IgM APC, CD23 biotinilado, a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSAria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * p<0.05.

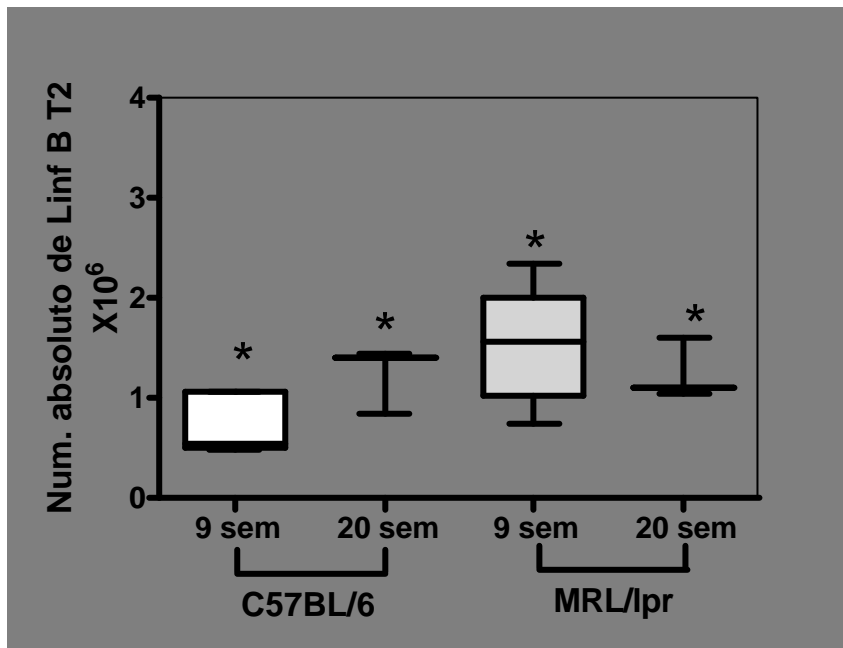


Figura 13. Número absoluto de linfocitos B Transitorios T2. Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: AA4-PE, CD19-Cy7, IgM APC, CD23 biotinilado a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSAria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * p >0.05

No existió una diferencia en el número de linfocitos B T3 en la cepa control a las 9 y 20 semanas ni en la cepa MRL/lpr a las 20 semanas Sin embargo, observamos un incremento con significancia estadística en la cepa MRL/lpr a las 9 semanas con respecto a la cepa control (9 y 20 semanas) pero no con la misma cepa a las 20 semanas. (Figura 14).

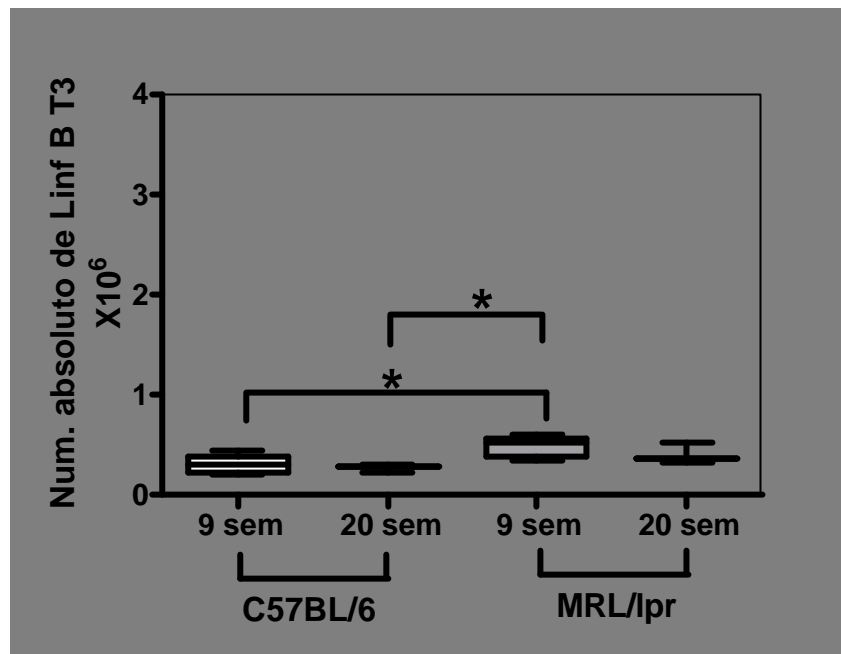


Figura 14. Número absoluto de linfocitos B Transitorios T3. Células de bazo de ratones de las cepas C57BL/6 y MRL/lpr (9 y 20 semanas de edad) se marcaron con anticuerpo anti: AA4-PE, CD19-Cy7, IgM APC, CD23 biotinilado a 4 °C durante 20 min., las células se lavaron y leyeron en el citómetro de flujo FACSaria y analizaron utilizando el programa FlowJo. * p<0.05.

DISCUSIÓN

Para el estudio de lupus eritematoso sistémico (LES) se han utilizado las cepas NZB/W, BXSB, MRL y MRL/lpr las cuales desarrollan una enfermedad similar a LES ^(14,15). Nosotros trabajamos con la cepa MRL/lpr, las manifestaciones aparecen a partir de la semana 12 y tienen una vida media de 6 meses ⁽¹⁴⁾, como control negativo utilizamos la cepa C57BL/6. Las manifestaciones de lupus son: proteinuria, anticuerpos anti-DNA, hipergamaglobulinemia entre otras ⁽¹⁷⁾, las cuales se midieron a las 9 y 20 semanas. Como esta reportado en la literatura nosotros encontramos que la cepa MRL/lpr presentó lupus (proteinuria, hipergamaglobulinemia y anticuerpos anti-DNA) a la semana 20.

El LES se caracteriza por presentar una desregulación de la respuesta inmune, se ha sugerido el posible papel patológico que tiene el linfocito B en el desarrollo y permanencia de la enfermedad por: la producción de auto-anticuerpos, secreción de citocinas inflamatorias y activación de linfocitos T autorreactivos ⁽²³⁾. En la cepa MRL/lpr se ha demostrado que al eliminar los linfocitos B las manifestaciones clínicas disminuyen ⁽²⁴⁾, por lo que decidimos determinar el número absoluto de las distintas subpoblaciones de linfocitos B en esta cepa MRL/lpr antes y cuando presentó las manifestaciones de lupus.

En bazo podemos encontrar distintas subpoblaciones de linfocitos B; los maduros donde principalmente se encuentran los foliculares (FO) y zona marginal (MZ) ⁽⁴⁾ y los inmaduros o transitorios (T) donde encontramos a los T1, T2 y T3 según la clasificación de Allman ^(3,4). Nosotros no encontramos diferencias en el número absoluto de linfocitos B totales y FO entre las distintas edades y cepas. Tampoco encontramos diferencia en el número de linfocitos B MZ en la cepa control con la edad, resultado que concuerda con lo reportado previamente ⁽²⁵⁾. En contraste, la cepa MRL/lpr presentó un aumento en el número de linfocitos B MZ a las 9 semanas con respecto a la cepa control, resultado semejante a lo reportado en otros modelos de autoinmunidad (NZB, B6.TC, NOD) ^(26, 27,28). Los linfocitos B MZ son los primeros en producir anticuerpos contra antígenos que entran a bazo, además de forma constitutiva e inducible expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras CD80 y

CD86, utilizando modelos de autoinmunidad se ha demostrado que estos linfocitos junto con los B-1 son la fuente principal de los auto-anticuerpos ⁽²⁸⁾. Por lo que decidimos comparar el número de linfocitos B MZ antes y cuando la enfermedad esta presente. En contraste, a lo reportado en la cepa NZB, ^(25,26) nosotros encontramos un incremento en el número de linfocitos B MZ cuando se presenta la enfermedad (20 semanas), esta diferencia se puede deber a que las manifestaciones de lupus en la cepa MRL/lpr son más agresivas y aparecen en menor tiempo que en la cepa NZB.

Tampoco encontramos diferencia en el número de linfocitos transitorios totales en la cepa control con respecto a la edad, semejante a lo reportado por Quinn III y sus colegas ⁽²⁸⁾, aunque este grupo solamente comparó 6, 8 10 y 12 semanas y nosotros 9 y 20 semanas. No se observó diferencia en la cepa MRL/lpr con la edad y con la cepa control.

En el número de linfocitos T1 a las distintas edades de la cepa control y la cepa MRL/lpr a las 9 semanas no se encontró diferencia. Teague y sus colegas encontraron una disminución de esta población al comparar la cepa MRL/lpr con la Balb/c que no tiene relación genética con la misma y no existió una diferencia cuando se compara con cepas que tienen relación genética AKR/J y C57BL/6 ⁽²⁹⁾ concordando con nuestros resultados. Los linfocitos T1 se consideran un punto de partida en la tolerancia periférica al presentar apoptosis cuando su BCR reconoce antígenos. No existen reportes previos donde se compare esta subpoblación antes y cuando los animales presentan lupus. Nosotros encontramos un incremento de esta población a las 20 semanas, cabe mencionar que esta cepa presenta una mutación en Fas por lo que el proceso de apoptosis está disminuido y es importante para la eliminación de los linfocitos T1 que reconocen antígenos, nuestros resultados sugieren la acumulación de clonas autorreactivas, aunque se tendrían que realizar más experimentos para confirmar o desechar esta propuesta.

En cuanto a los linfocitos T2, no encontramos diferencia entre las distintas edades y cepas. En el número de linfocitos T3 solamente observamos un incremento en la cepa MRL/lpr a las 9 semanas en comparación con la

C56BL/6, resultado que concuerda con lo reportado por Sekiguchi y sus colegas quienes compararon C56BL/6 con B6.56R (cepa que produce anticuerpos anti-DNA) ⁽³⁰⁾, pero difiere con lo reportado por Teague y sus colegas cuando se compara MRL/lpr con Balb/c ⁽²⁹⁾.

Nuestros resultados muestran un incremento de las subpoblaciones de linfocitos B T1 y de MZ cuando los ratones presentan la enfermedad, sugiriendo la participación de estas subpoblaciones en el desarrollo de LES. Aunque sería interesante determinar si estas subpoblaciones participan directamente en el desarrollo de la enfermedad o es consecuencia de la misma.

CONCLUSIONES.

- No existe diferencia en el número absoluto de linfocitos B en cepas que desarrollan o no lupus, ni cuando se presenta la enfermedad
- Los linfocitos B T3 se encuentran aumentados a las 9 semanas en la cepa que desarrolla la enfermedad en comparación con la cepa control
- Solamente las subpoblaciones de linfocitos B T1 Transitorios-1 y de Zona Marginal, aumentan cuando se presenta la enfermedad

GLOSARIO

Anergia. Estado de no respuesta a la estimulación antigénica.

Apoptosis. Proceso de muerte celular caracterizado por escisión del ADN, condensación y fragmentación nuclear y formación de vesículas en la membrana plasmática que conduce a la fagocitosis de la célula sin provocar respuesta inflamatoria alguna.

Autoanticuerpo. Anticuerpo producido por un individuo que es específico para un antígeno propio.

Autoinmunidad. Estado del sistema inmune caracterizado por una respuesta a autoantígenos que ocurre cuando fracasan los mecanismos de autotolerancia.

Célula Plasmática. Linfocito B totalmente diferenciado, secretor de anticuerpos.

Centro germinal. Región del folículo del bazo, los ganglios linfáticos o el tejido linfático de las mucosas que se forma durante la respuesta inmunitaria humoral

Citocinas. Proteínas sintetizadas por muchos tipos de células distintas que intervienen en las reacciones inflamatorias e inmunitarias.

Citometría de flujo. Método de análisis del fenotipo de las poblaciones celulares para el que se necesita un equipo especial (citómetro de flujo) que permite detectar la fluorescencia de células individuales en suspensión y determinar el número de células que expresan la molécula a la que se une el marcador fluorescente.

Edición del receptor. Proceso por el que algunos linfocitos B inmaduros que reconocen antígenos propios en la médula ósea pueden ser inducidos a cambiar sus especificidades Ig.

Enfermedad autoinmune. Enfermedad causada por una pérdida de la autotolerancia, de forma que el sistema inmunitario adaptativo responde a autoantígenos provocando lesiones celulares e histicas.

Fab. Fragmento proteolítico de una molécula de anticuerpo IgG que consta de una cadena ligera completa emparejada con un fragmento de cadena pesada que contiene el dominio variable y solo el primer dominio constante.

Fragmento F(ab)₂. Fragmento proteolítico de una molécula de IgG que consta de dos cadenas ligeras completas, pero solo el dominio variable, el primer dominio constante y la región bisagra de las dos cadenas pesadas.

Glomerulonefritis. Inflamación de los glomérulos renales que suele deberse a mecanismos inmunopatológico, como la unión de anticuerpos a antígenos que se expresan en el glomérulo.

ANEXO

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- PBS 10X

i. NaCl	40,0 g
ii. KCl	1.0 g
iii. Na ₂ HPO ₄	12,2 g
iv. KH ₂ PO ₄	1,2 g
v. Agua destilada	500 mL

- PBS

i. PBS 10 X	100 mL
ii. Agua destilada	900 mL

- PBS Tween 0.05%. (Solución de lavado ELISA)

i. PBS IX	1000 mL
ii. Tween	0.5 mL

- PBS BSA 2% Tween 0.05% (solución de bloqueo ELISA)

i. PBS-Tween	100 mL
ii. BSA 2%	2 g

- Regulador de Bicarbonatos

i. Na ₂ CO ₃	0,795 g
ii. NaHCO ₃	1,465 g
iii. Agua destilada	500 mL

- Fosfatasa Alcalina

- i. Tabletas de fosfatasa 2 tab.
 - ii. Regulador de bicarbonatos 10 mL
 - iii. MgCl₂ 20 µL
- BSA 0.5%
 - i. BSA 2.5 g
 - ii Agua destilada 500 mL
- Azida de Sodio 1%
 - i. Azida de sodio 1 g
 - ii. Agua destilada 100 mL
- Regulador para FACS (Solución de lavado)
 - i. PBS 1X 200 mL
 - ii. SFB (suero fetal de bovino) 1 mL
 - iii. Azida de sodio 0.005% 1 mL
 - iv. Ajustar el pH a 7.4

REFERENCIAS.

1. Abbas A, Lichtman A, Immunologia celular y molecular. 5th ed. Madrid: Elsevier; 2004.129-212
2. Wang H & Clarke S H. Regulation of B-cell development by antibody specificity. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:246-50
3. Coleman R, Mattew T, Allman D. Generation of peripheral B cells occurs via two spatially and temporally distinct pathway. *Blood.*2007;109:2521-28
4. Thomas M D, Srivastava B, Allman D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol.* 2006;239:92-102
5. Chung J B, Silverman M, Monroe J G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 2003;24:342-48
6. Kanayama N, Cascalho M, Ohmori H. Analysis of Marginal Zone B cell development in the mouse with limited B cell Diversity: role of the antigen receptor signals in the recruitment of B Cell to the marginal Zone. *J Immunol.* 2005;174:1438-45
7. T. Guo B, Wei B., Braun J, Awlings D J. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev.* 2004;197:161-78
8. C. Janeway. *Immunobiology the immune system in health and disease.* 6th ed. New York :Garland Science; 2005.375-83
9. Harris D P. et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.*2000;1:475-82
10. Lipsky P E. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* 2001;2:764-66
11. Jennifer H, Anolik M D. B cell Biology and dysfunction in SLE. *Bull NYU Hosp.* 2007;65:182-3

- 12.** Grammer A C, Lipsky P E. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* .2003;4;22-27
- 13.** Mamula M J, Fatenejad S, Craft J. B cells process and present lupus autoantigens that autoimmune T cell responses. *J Immunol*. 1994;152:1453-61
- 14.** Andrews B.S. et al Spontaneous murine lupus-like syndromes, Clinical and immunopathological manifestations in strain. *J Exp. Med.*1978;148:1198-1215
- 15.** Furukawa F., Yoshimasu T. Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.*2005;4:345-50
- 16.** Tomita Y, Jyonouchi H, Engelman R W, Day NK., Good R A. Preventive action of carotenoids on the development lymphadenopathy and proteinuria in MRL-lpr/lpr mice. *Autoimmunity* 1993;16:95-102
- 17.** Adachi M. et al. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:2131-36
- 18.** Lynch D H, Ramsdell F, Alderson M R. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today*. 1995;16 :569-74
- 19.** Theofilopoulos A N , Dixon FJ. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol Rev.* 1981;55:179-216
- 20.** Brey R L, Cote S, Barohn R, et al. Model for the neuromuscular complications of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995;4:209-12
- 21.** Chan O T M, Madaio M P, Shlomchik M J. B Cells Are Required for Lupus Nephritis in the Polygenic, Fas-Intact MRL Model of Systemic Autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163:3592-96

- 22.** Chan O T, Hannum L G, Haberman A M, et al A. Novel mouse with B cell but lacking serum antibody reveals an antibody independent role for B cells in murine lupus *J Exp Med.* 1999;189:1639-48
- 23** Mandick L, Ridge N, Fields M. Role of cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol.*2008;20:1-7
- 24** Li Y, Chen F, Putt M, Koo YK, Madaio M, Cambier JC, Cohen PL, Eisenberg RA. B cell depletion with anti-CD79 mAbs ameliorates autoimmune disease in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 2008;181:2961-72
- 25** Atencio S, Amano H, Izui S, Kotzin BL. Separation of the New Zealand Black genetic contribution to lupus from New Zealand Black determined expansions of marginal zone B and B1a cells. *J Immunol* 2004;172:4159-66
- 26** Roy V, Chang N H, Cai Y, Bonventi G, Wither J. Aberrant IgM signaling promotes survival of transitional T1 B cells and prevents tolerance induction in lupus-prone New Zealand black mice. *J Immunol.* 2005;175:7363-71.
- 27** Duan B, Niu H, Xu Z, Sharpe A H, Croker B P, Sobel E S, Morel L. Intrafollicular location of marginal zone/CD1d(hi) B cells is associated with autoimmune pathology in a mouse model of lupus. *Lab Invest.* 2008;88:1008-20.
- 28** Lopes C T, Foote J, Kearney J F. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation *Curr Opin Immunol.* 2005;17:244-50
- 29** Teague B N, Pan Y, Mudd P A, Nakken B, Zhang Q, Szodoray P, Kim-Howard X, Wilson P C, Farris A D. Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus. *J Immunol.* 2007;178:7511-5
- 30** Sekiguchi D R, Yunk L, Gary D, Charan D, Srivastava B, Allman D, Weigert MG, Prak E T. Development and selection of edited B cells in B6.56R mice. *J Immunol.* 2006;176:6879-87