

Investigación original

Subpoblaciones de linfocitos B y su expresión de CD1d en pacientes con lupus eritematoso sistémico

Claudia Carolina Sánchez Parra^a, Mauricio Rojas López^a, Lina M. Yassin^b
y Gloria María Vásquez Duque^{a,c}

^a Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Grupo de Ciencias Básicas Facultad de Medicina, CES, Medellín, Colombia

^c Grupo de Reumatología Universidad de Antioquia (GRUA), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de octubre de 2013

Aceptado el 27 de enero de 2014

Palabras clave:

B reguladoras

Lupus eritematoso sistémico

CD1d

R E S U M E N

Introducción: Los linfocitos B (LB) se consideran el centro de la desregulación inmune en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), principalmente, por su producción de autoanticuerpos. Recientemente, se demostró la existencia de LB, incluidos en los B transicionales, con capacidad reguladora (Breg) y fenotipo CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. En humanos se demostró la importancia de CD80 y CD86 en su función reguladora. El papel de CD1d aún no ha sido evaluado.

Objetivo: Evaluar la frecuencia de LB maduros, memoria y transicionales, en controles y pacientes con LES, además de la expresión de CD1d y correlacionarla con la actividad de la enfermedad medida por SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). **Materiales y métodos:** Se evaluó por citometría de flujo la frecuencia de subpoblaciones de LB basados en la expresión de CD19, CD24 y CD38, además de CD1d, en controles con otras enfermedades autoinmunes (OEA), individuos sanos y pacientes con LES, y se correlacionó con SLEDAI.

Resultados: Se evidenció una disminución significativa en el porcentaje de LB de memoria en pacientes LES y OEA, sin alteraciones en las subpoblaciones de LB maduros y transicionales. La expresión de CD1d no evidenció diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones ni se correlacionó con SLEDAI.

Conclusión: La disminución de la subpoblación de memoria fue previamente descrita en LES y se ha asociado a algunos tipos de tratamiento. Aunque CD1d se ha asociado a la función de Breg en murinos, no hubo diferencias significativas en su expresión en las subpoblaciones y queda por clarificar su papel en la función de las Breg humanas.

© 2013 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.

Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: c.sanchezp@gmail.com (C.C. Sánchez Parra); mrojaslop@hotmail.com (M. Rojas López); yascatorce@yahoo.com (L.M. Yassin); glomavas@gmail.com (G.M. Vásquez Duque).

B cell subsets and their expression of CD1d in patients with systemic lupus erythematosus

A B S T R A C T

Keywords:

Bregs

Systemic lupus erythematosus

CD1d

Introduction: B lymphocytes are considered the center of immune dysregulation in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). It has recently been demonstrated that there is a B cell with regulatory capacities (Breg) included in transitional B lymphocytes with the phenotype CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. The importance of CD80 and CD86 in the regulatory function of the Bregs has been demonstrated in humans, but the role of CD1d has not been evaluated.

Objective: To evaluate the frequency of mature, memory and transitional B cells in SLE patients and controls, the expression of CD1d among these cells, and its correlation with the activity of the disease measured using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI).

Materials and methods: The frequency of the B cell subsets was evaluated by flow cytometry based on the expression of CD19, CD24 and CD38, as well as CD1d in these cells in SLE patients and controls, and were correlated with the activity of the disease measured using the SLEDAI.

Results: A significant reduction in the percentage of memory B cells was observed in SLE patients and other autoimmune conditions, with no changes in the mature or transitional B cell subsets. Similarly, no significant differences were observed in the expression of CD1d in any of the subsets, nor was there any correlation with the SLEDAI.

Conclusion: The reduction of the memory subset has been previously described in SLE, and has been associated with some types of treatment. The expression of CD1d in all the subsets was observed, but its role in the regulatory function of the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} cells is still not clear.

© 2013 Asociación Colombiana de Reumatología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Típicamente, las células B han sido descritas como elementos fundamentales en la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), debido a la producción de autoanticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos solubles y celulares, observándose una correlación positiva entre el número de células productoras de autoanticuerpos y la actividad de la enfermedad¹. Recientemente, se ha reportado la presencia de células B reguladoras (Breg); en diferentes modelos de enfermedades autoinmunes tales como colitis autoinmune², inflamación intestinal crónica³, encefalitis autoinmune⁴ y artritis inducida por colágeno⁵.

El papel de las Breg ha sido estudiado, principalmente, en modelos murinos como el NZB/W, en el cual se describió la presencia de células B IL-10⁺CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi}, denominadas B10, las cuales poseen actividad inhibitoria de la inflamación^{6,7}. Ratones NZB/W deficientes de células B (CD19^{-/-}), presentan una glomerulonefritis más severa, acompañada de un incremento en la tasa de mortalidad y ausencia de la subpoblación reguladora B10 CD1d^{hi}CD5⁺ respecto a ratones silvestres NZB/W CD19^{+/+}, los cuales aumentan el número de células B10 durante el transcurso de la enfermedad. Estos hallazgos pudieran explicarse por la presencia de células B10 en los ratones tipo silvestre NZB/W CD19^{+/+} comparados con los ratones CD19^{-/-}⁸.

Además de las células B10, se ha descrito que la subpoblación de células B transicionales precursoras de zona marginal

(T2-MZP), contienen por lo menos un subgrupo de células B con capacidad reguladora. La transferencia adoptiva de células B T2-MZP previamente estimuladas con agonista de CD40 a ratones MRL/lpr con lupus, indujo una remisión de los síntomas clínicos, disminución de la actividad de la enfermedad y del daño renal⁹, lo cual sugiere que estas células T2-MZP presentan una actividad reguladora la cual depende de la molécula CD40.

Dado que las células transicionales CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} se han descrito como los análogos en sangre periférica de las células T2 en humanos^{10,11}, se ha sugerido que esta subpoblación de células B pudiera contener a las células B reguladoras. Un estudio realizado en pacientes con LES, demostró la presencia de un subgrupo de células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} que adquiriría capacidad reguladora luego de la estimulación por CD40, suprimiendo la diferenciación de las células T efectoras CD4⁺ hacia una respuesta Th1, mediante un mecanismo dependiente de IL-10. Además, se observó que la frecuencia de estas células en sangre periférica de pacientes con LES estaba aumentada pero estas fueron refractarias a la estimulación por CD40 produciendo menos IL-10, lo cual reducía su capacidad reguladora¹².

Además de la importancia del CD40, en la función reguladora ejercida por las células CD19⁺CD24^{hi}CD38, se ha descrito la participación de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86^{12,13}.

Paralelamente, en un modelo murino de enfermedad intestinal crónica, se describió la importancia de la molécula CD1d en la función reguladora de las células B, ya que se pudo evidenciar que la transferencia de células B deficientes de

CD1d permitió la progresión de la enfermedad, contrario a lo observado luego de la transferencia de células B tipo silvestre, evidenciando la existencia de una subpoblación de células B localizada en el tejido linfoide asociado al intestino, la cual, bajo un ambiente inflamatorio, se caracteriza por la regulación positiva de CD1d, además de la producción de IL-10 con capacidad de suprimir la inflamación, por medio de la regulación negativa de la cascada de señalización de la IL-1 y la activación del factor de transcripción STAT3³.

Otros estudios también han demostrado la importancia de moléculas como CD1d o CD19 en la acción reguladora ejercida por las células B. Deficiencias en la expresión de estas moléculas, provocan una reducción significativa de la subpoblación de células B productoras de IL-10, lo cual sugiere que CD1d y CD19 son de gran importancia para el desarrollo de LB y para su función reguladora medida por la producción de IL-10⁶.

La regulación mediada por CD1d podría explicarse por una interacción de las células que la expresan con las iNKT, subtipo de células NK con aparente capacidad reguladora, como se ha demostrado en algunos modelos de enfermedades autoinmunes¹⁴. Se conoce también que la porción intracelular de CD1d está asociada a la cascada de señalización de la IL-10¹⁵.

Por ende, es necesario caracterizar no solo las subpoblaciones de células Breg presentes en pacientes con LES, sino también evaluar la expresión de marcadores como el CD1d en las células B reguladoras, lo cual ayudaría a explicar las alteraciones funcionales previamente descritas en esta subpoblación de células en pacientes con LES y si estas son explicables por diferencias en las frecuencias de las subpoblaciones de células B o por la expresión diferencial de CD1d como molécula moduladora de la función de las Breg, lo que a su vez podría derivar en nuevos blancos terapéuticos.

Materiales y métodos

Pacientes y controles

Se llevó a cabo, entonces, un estudio de tipo cuasi experimental de corte transversal, en el cual el tamaño muestral se decidió a conveniencia. Se incluyó un grupo de 21 pacientes diagnosticados con LES de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR)¹⁶ y se clasificaron

de acuerdo al índice de actividad de la enfermedad, en actividad severa (≥ 4) y moderada o baja (< 4) de acuerdo con la calificación dada por el SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)¹⁷.

Además, se incluyó un grupo de controles sanos ($n=15$) y un grupo de sujetos con otras enfermedades autoinmunes (OEA) diferentes a LES ($n=13$), tales como esclerosis sistémica⁶, artritis reumatoide³, artritis psoriásica¹, síndrome de Sjögren¹, poliangiitis granulomatosa¹ y sarcoidosis¹, los cuales recibían tratamiento inmunosupresor similar al de los pacientes con LES, incluyendo esteroides a dosis varias, metotrexate, ciclofosfamida y micofenolato por diferentes tiempos, con una mediana de 45 meses de tratamiento inmunosupresor (rango intercuartílico de 1 a 216). Se excluyeron aquellos pacientes o controles que presentaban infecciones al momento de la toma de la muestra y pacientes que presentaban inmunodeficiencias primarias o secundarias, o aquellos sujetos que no firmaran el consentimiento informado.

Tanto los pacientes con LES como los OEA fueron reclutados en el Servicio de Reumatología de la Universidad de Antioquia en el Hospital San Vicente Fundación (tabla 1).

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y tinción extracelular

Para la obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se les realizó venopunción a pacientes y controles para obtener aproximadamente 8 mililitros de sangre periférica, la cual fue anticoagulada con EDTA. Posteriormente, la muestra se diluyó en una proporción 1:1 en buffer salino fosfatado (PBS) 1X y se llevó a cabo una separación por gradiente de densidad con Ficoll Histopaque 1077 (Sigma), mediante centrifugación por 30 minutos a $800 \times g$ y se realizaron los respectivos lavados y la evaluación de la viabilidad celular con azul de tripano al 0.1%.

Para la tinción extracelular se tomaron 0.5×10^6 PBMC y se resuspendieron en 50 μ l de una solución de PBS 1X, 4% suero bovino fetal inactivado (SBFi) y 0.01% de azida de sodio (buffer de bloqueo), por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó una solución de anticuerpos anti-CD19-Pacific blue (2,5 μ l) (Clona HIB19), anti-CD24-FITC (2,5 μ l) (Clona ML5), anti-CD38-PerCP (5 μ l) (Clona HIT2) y

Tabla 1 – Datos clínicos y demográficos de pacientes con LES, controles OEA e individuos sanos

	Pacientes con LES	Controles OEA	Individuos sanos
Número	21	13	15
Edad (mediana [RI])	29 (RI: 24,50-42)	44 (RI: 31-54,50)	27 (RI: 24-32)
Sexo	F: 20 M: 1	F: 12 M: 1	F: 14 M: 1
Tratamiento	Prednisona, cloroquina, micofenolato de mofetilo, ciclofosfamida, metilprednisolona, azatioprina	Prednisona, metilprednisolona, cloroquina, betametasona de uso nasal	–
SLEDAI (media [desviación estándar])	10 (2-18,50)	-	-

F: femenino; M: masculino.

anti-CD1d-PE (Clona 51.1) o su control isotópico (2,5 μ l) (Clona MG2v-57) (Biolegend Roselle Street, San Diego), y se incubó por 25 minutos a 4°C en oscuridad. Las células fueron fijadas con 2% de paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos a 4°C y basados en su marcaje se determinaron 3 subpoblaciones de linfocitos B (LB) por citometría de flujo: células B maduras ($CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$), de memoria ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{-}$) y transicionales 2 ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$) e igualmente se evaluó la expresión de CD1d en estas subpoblaciones. La lectura de las células se realizó en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego CA).

Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas no paramétricas, por lo cual se muestran los datos en medianas y rango intercuartílico (RI). Sin embargo, se realizó prueba de normalidad de los datos (D'Agostino & Pearson).

Para comparar el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células B y el porcentaje de las células positivas para CD1d, así como las diferencias en la expresión de CD1d entre las subpoblaciones celulares de pacientes y controles,

se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y el pos-test de Dunn's. Para correlacionar la expresión de CD1d y el porcentaje de las diferentes subpoblaciones con la actividad de la enfermedad (SLEDAI), se utilizó la correlación de Spearman.

Los datos de las citometrías se analizaron con el programa FLOWJO 7.6.1. Tree Star y los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma (GraphPad Versión 5.00, La Jolla, EE.UU.).

Resultados

Fenotipificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B (LB)

Para evaluar la frecuencia de las subpoblaciones de LB de pacientes y controles, se realizó un análisis partiendo de las células positivas para CD19 y dentro de la región $CD19^+$, basados en la expresión diferencial de CD24 y CD38 se definieron las células B maduras ($CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$), de memoria ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{low}$) y transicionales 2 (T2) ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$) (fig. 1).

Inicialmente, se evaluó el porcentaje de LB $CD19^+$ en pacientes y controles. No se observaron diferencias estadísti-

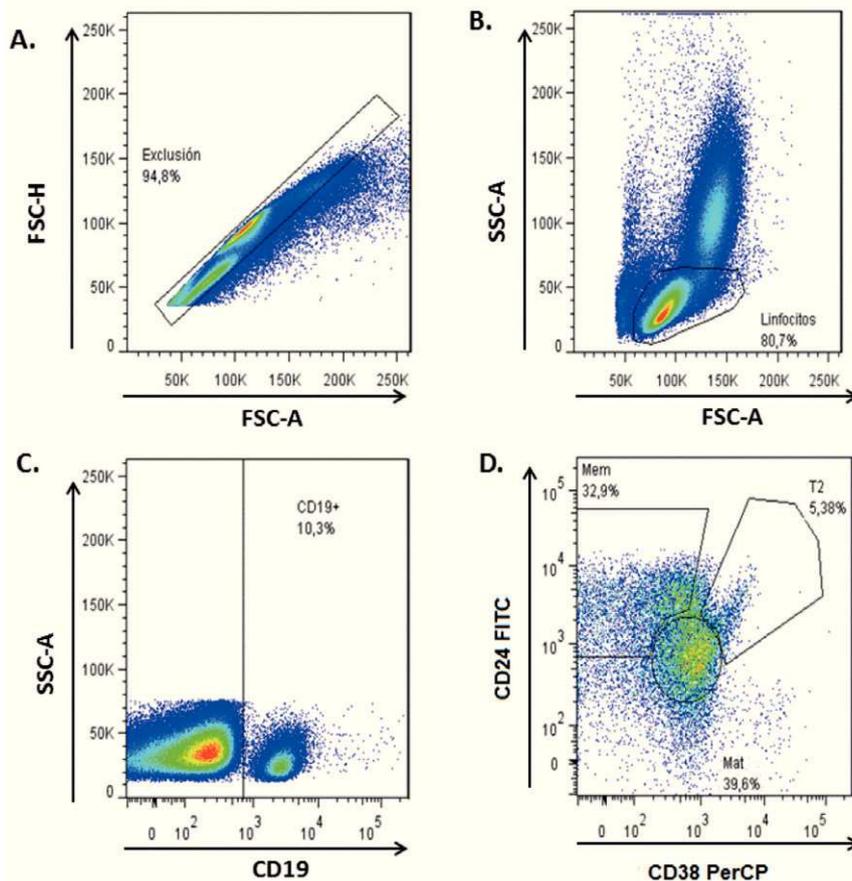


Figura 1 – Estrategia de análisis de subpoblaciones de linfocitos B por citometría de flujo. El análisis de las subpoblaciones se inició con una exclusión de agregados con los parámetros de área y altura (A), seguido de la determinación de la región de linfocitos por tamaño y granularidad (B) y evaluando así, dentro de esta región, el porcentaje de células $CD19^+$ (C) y dentro de esta región se evaluó la expresión de CD38 y CD24 para determinar así la subpoblación de células B maduras ($CD19^+CD24^{int}CD38^{int}$), de memoria ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{low}$) y las T2 ($CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$) (D).

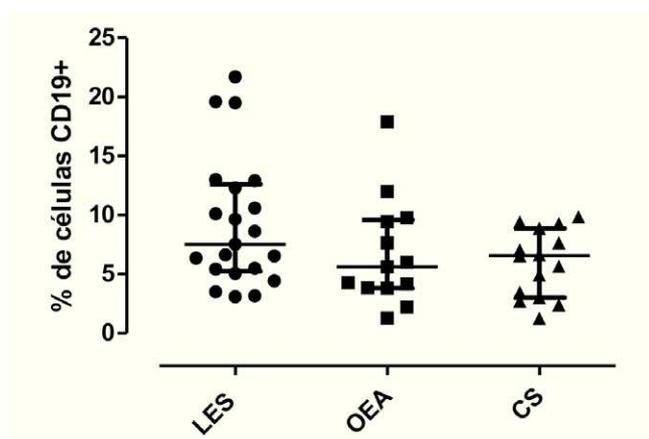


Figura 2 – Porcentaje de células CD19⁺ en pacientes con LES, controles con OEA y controles sanos.

amente significativas en el porcentaje de células CD19⁺ entre pacientes con LES (mediana: 7.54%, RI: 5.24-12.60), controles con OEA (5.62%, RI: 3.8-9.6) y controles sanos (6.57%, RI: 3.02-8.88) (fig. 2).

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos B evidenció una disminución en el porcentaje de células de memoria en pacientes con LES (Mediana: 12.90%, rango intercuartílico (RI): 9.17-17.90), comparado con controles OEA (13.10%, RI: 9.16-19.55) y controles sanos (23.6%, RI: 18.20-29.0) ($p=0.0016$) (fig. 3A). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células B maduras entre controles sanos (44%; RI: 40.10-48.20), pacientes con LES (46.40%; RI: 41.70-58.40) y controles OEA (41.20%; RI: 29.35-53.05) (fig. 3B). De igual forma, el porcentaje de células B transicionales 2 no difirió entre controles sanos (6.09%; RI: 4.10-9.95), pacientes con LES (6.49%; RI: 3.50-9.70) y controles OEA (7.69%; RI: 6.74-16.15) (fig. 3C).

Expresión de CD1d en las diferentes subpoblaciones de LB

Debido que CD1d ha sido previamente descrito en algunos modelos murinos de autoinmunidad como un marcador fenotípico de las Breg, con papel en la acción reguladora mediada por estas células^{6,18,19}. Se evaluó el porcentaje de células CD1d⁺ en las tres subpoblaciones de LB evaluadas y su expresión medida como intensidad media de fluorescencia (IMF).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de LB CD1d⁺ maduros entre pacientes con LES (72.2%, RI: 41.5-87.7), controles con OEA (87.3%, RI: 78.6-85.7) y controles sanos (76.6%, RI: 69.8-84.5) (fig. 4A). El porcentaje de LB de memoria CD1d⁺ tampoco mostró diferencias entre pacientes con LES, controles con OEA y controles sanos (76.9%, RI: 55.7-85.7; 76.1%, RI: 58.4-87.6; 79.9%, RI: 66.7-87.1, respectivamente) (fig. 4B). Asimismo, en el porcentaje de LB transicionales 2 CD1d⁺ no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con LES, controles con OEA y controles sanos (87.2%, RI: 58.4-91.3; 81.7%, RI: 77.2-95.6; 68.9%, RI: 54.2-85.5, respectivamente) (fig. 4C).

Aunque, al igual de como se había descrito previamente, las células B transicionales CD24^{hi}CD38^{hi} tienen una mayor expresión de CD1d, en este estudio se evidenció un aumento significativo en la expresión de esta molécula en la subpoblación CD24^{hi}CD38^{hi} en los pacientes LES y OEA evaluados²⁰ (fig. 5D-F). Sin embargo, no se observaron diferencias en la IMF de CD1d en los LB maduros entre los pacientes con LES, OEA y controles sanos (IMF LES: 819, RI: 582-1184; IMF OEA: 898, RI: 707-1036; IMF Control Sano: 710, RI: 640-911, respectivamente) (fig. 6A), ni en los LB de memoria de pacientes con LES (IMF: 1026, RI: 748-1336), controles con OEA (IMF: 935, RI: 738-1075) y controles sanos (IMF: 1002, RI: 837-1140) (fig. 6B). De igual forma en la IMF de CD1d de los LB transicionales 2 de pacientes con LES (IMF: 1455, RI: 1010-2046), controles con OEA (IMF: 1394, RI: 1063-2839) y controles sanos (IMF: 994, RI: 648-1601) (fig. 6C).

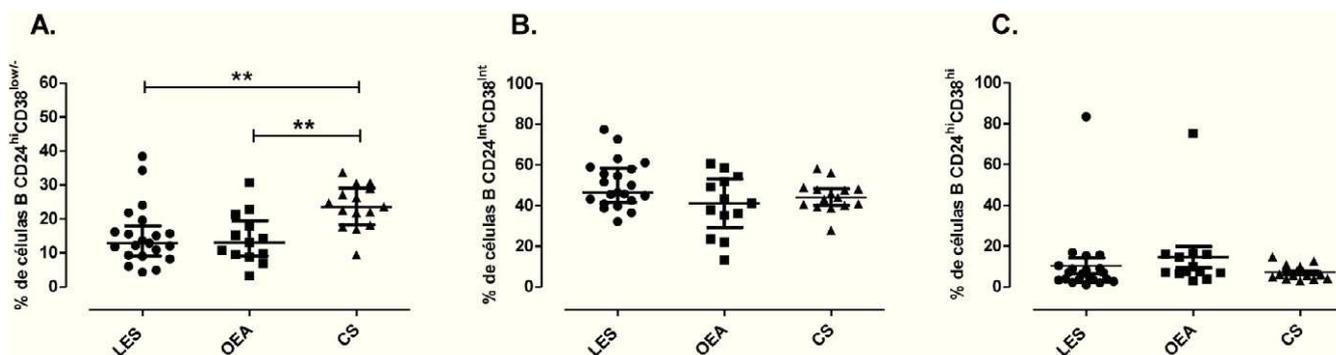


Figura 3 – Distribución de subpoblaciones de células B en pacientes y controles. Porcentaje de células B de memoria (CD24^{hi}CD38^{low/-}) (A), maduras (CD24^{int}CD38^{int}) (B) transicionales (CD24^{hi}CD38^{hi}) (C) en pacientes con LES (n=21), controles OEA (n=13) y controles sanos (n=15). Estos datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn's. Se presentan medianas y rangos intercuartílicos (RI) (** $P < 0.01$).

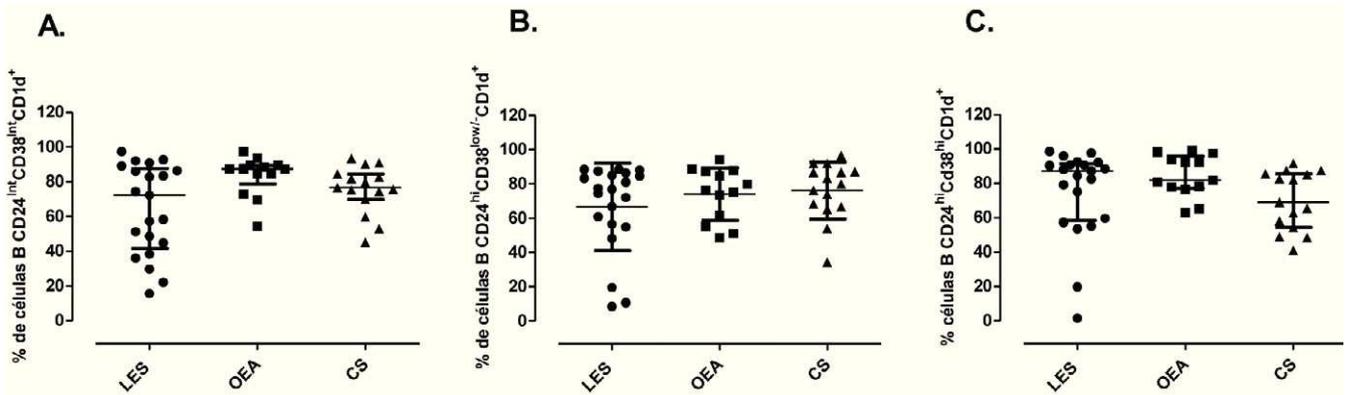


Figura 4 – Subpoblaciones de células B CD1d⁺. Porcentaje de células B CD1d⁺ maduras (CD24^{int}CD38^{int}) (A), de memoria (CD24^{hi}Cd38^{low/-}) (B) y transicionales (CD24^{hi}CD38^{hi}) (C) de pacientes con LES (n=21), controles OEA (n=13) y controles sanos (n=15). Estos datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal Wallis y el post-test de Dunn's. Se presentan medianas y rangos intercuartílicos (RI).

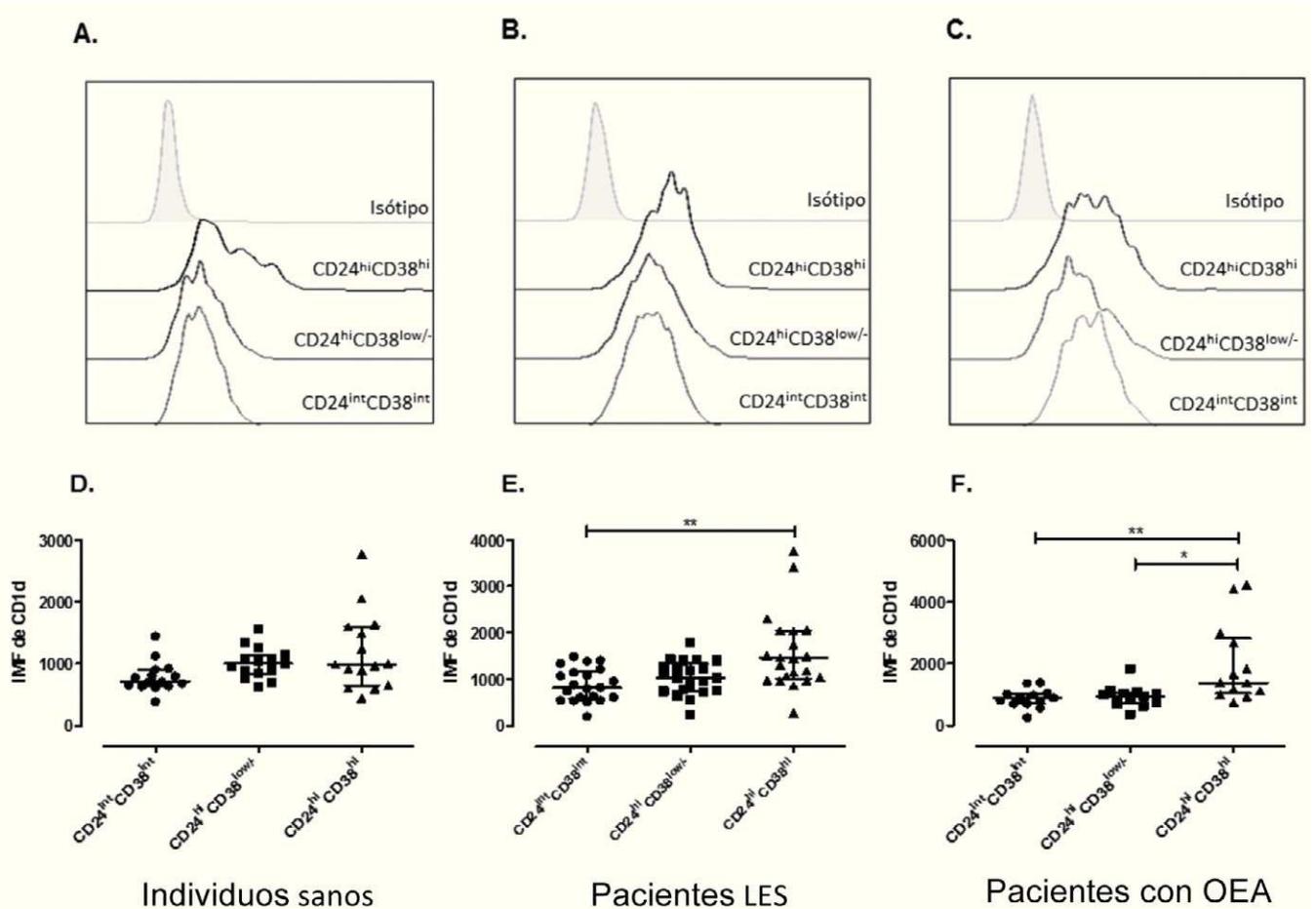


Figura 5 – Expresión de CD1d en las subpoblaciones de células B. Histogramas superpuestos de la expresión de CD1d en células B maduras (CD24^{int}CD38^{int}), de memoria (CD24^{hi}Cd38^{low/-}) y transicionales (CD24^{hi}CD38^{hi}), gráfica representativa de un individuo sano (A), un paciente con LES (B), y un control con OEA (C). Intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD1d en células B maduras (CD24^{int}CD38^{int}), de memoria (CD24^{hi}Cd38^{low/-}) y transicionales (CD24^{hi}CD38^{hi}) de controles sanos (n=15) (D), pacientes con LES (n=21) (E) y controles con OEA (n=13) (F). Estos datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn's. Se presentan medianas y rangos intercuartílicos (RI) (*P< 0.05 **P< 0.01).

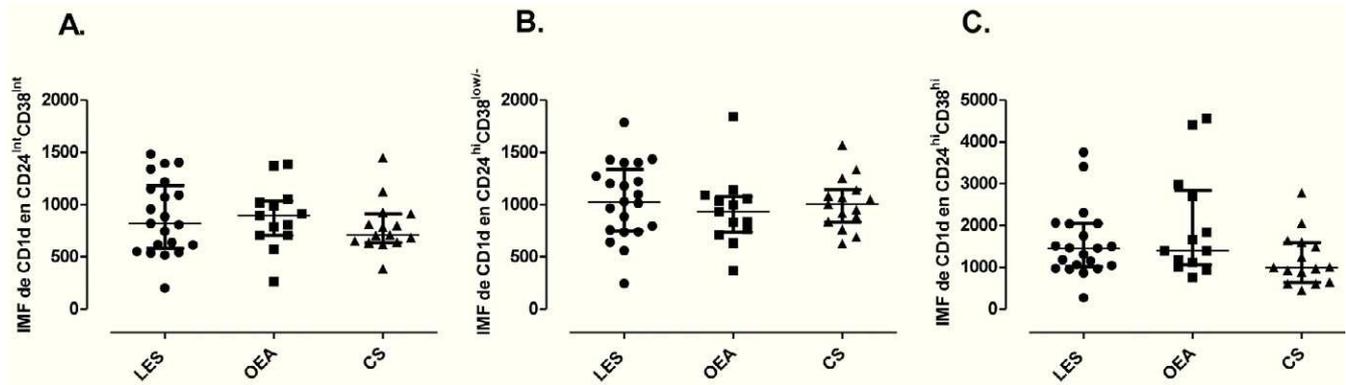


Figura 6 – Expresión de CD1d en subpoblaciones de células B. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de células CD1d en células B maduras ($CD24^{int}CD38^{int}$) (A), de memoria ($CD24^{hi}CD38^{low/-}$) (B) y transicionales ($CD24^{hi}CD38^{hi}$) (C) de pacientes con LES (n=21), controles OEA (n=13) y controles sanos (n=15). Estos datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal Wallis y el post-test de Dunn's. Se presentan medianas y rangos intercuartílicos (RI).

Correlación entre la expresión de CD1d en las diferentes subpoblaciones de LB y la actividad de la enfermedad

Paralelamente, se quiso evaluar una posible relación entre las subpoblaciones de células B $CD1d^+$ y la actividad del LES. Sin embargo, no se encontró una correlación entre el SLEDAI como medida de la actividad de la enfermedad y el porcentaje de LB $CD1d^+$ maduros ($r = -0,213$), de memoria ($r = -0,274$) o transicionales 2 ($r = -0,196$) ni tampoco se encontró correlación entre la IMF de CD1d de ninguna de las tres subpoblaciones y el SLEDAI (fig. 7).

Discusión

Muchas investigaciones en los últimos años se han enfocado en la búsqueda de una manera clara para definir el fenotipo que mejor permita diferenciar y clasificar a las células B con

capacidad reguladora, convirtiéndose en un reto para esta línea de investigación.

Hasta la fecha se han descrito diferentes fenotipos de células B con capacidad reguladora, entre ellos LB transicionales 2 ($T2$) $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ en humanos, cuyos equivalentes murinos tienen un fenotipo $IgM^{hi} IgD^{hi} CD5^+CD10^+CD20^+CD27^-CD1d^{hi}$, los cuales se han descrito como los análogos de los linfocitos B T2 en humanos¹². De igual forma se ha descrito en humanos una subpoblación $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ similar a las células B10 murinas, denominadas B10pro, las cuales han sido caracterizadas con los marcadores $CD19^{hi} CD38^{hi} CD1d^{hi}CD20^{hi}CD21^{hi}CD23^{hi} CD24^{hi}CD25^{hi}CD27^{hi}$ ²¹ y posteriormente se describió en sangre periférica en humanos, una subpoblación de células B productoras de altos niveles de IL-10 y TGF- β con un fenotipo $CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi}$ ²².

La subpoblación de LB $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ es una de las subpoblaciones de células Breg que más ha sido estudiada, en especial en enfermedades autoinmunes. Nuestros hallaz-

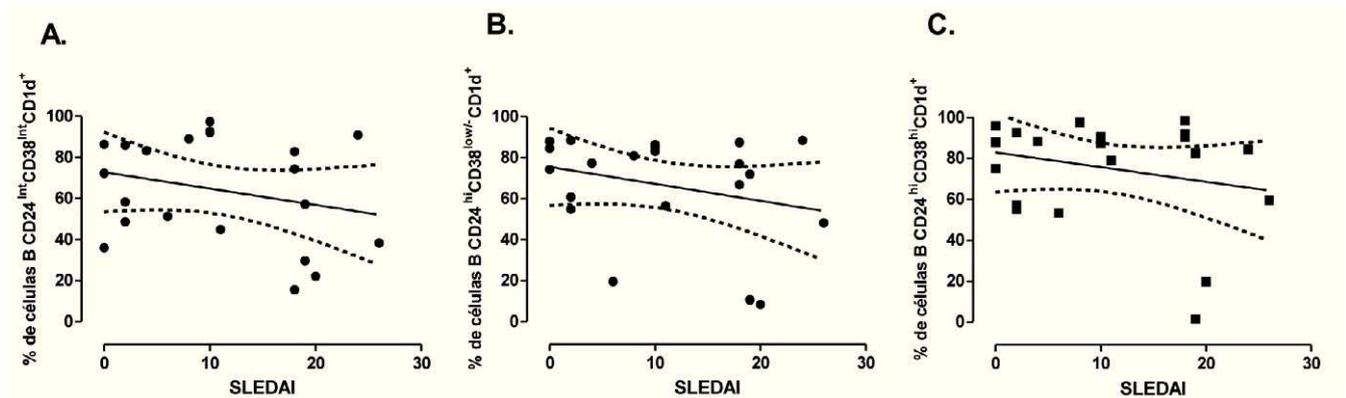


Figura 7 – Correlación del porcentaje de subpoblaciones de LB y la actividad del LES. Correlación entre la actividad de la enfermedad medida por SLEDAI y el porcentaje de células B $CD1d^+$ maduras ($CD24^{int}CD38^{int}$) (A), de memoria ($CD24^{hi}CD38^{low/-}$) (B) y transicionales ($CD24^{hi}CD38^{hi}$) (C) de pacientes con LES (n=21), controles OEA (n=13) y controles sanos (n=15). Estos datos fueron analizados por medio de la prueba de correlación de Spearman.

gos no revelaron diferencias significativas en el porcentaje de células Breg entre pacientes con LES y controles sanos o controles OEA. Esto discrepa de lo observado en el estudio de Londres-Reino Unido realizado por Blair et al., quienes describieron un incremento en la frecuencia de esta subpoblación en pacientes con LES, comparado con controles sanos y pacientes con otras enfermedades autoinmunes¹². Sin embargo, resultados similares a los nuestros han sido previamente reportados con otra subpoblación de células Breg.

En cuanto a las otras subpoblaciones evaluadas en este estudio, se observó una disminución en el porcentaje de células B de memoria con fenotipo CD24^{hi}CD38^{low/-} en pacientes con LES y OEA, comparado con controles sanos. Estos resultados concuerdan con los presentados por Blair et al., en 2010, en los cuales se observó una disminución en el porcentaje de células B de memoria CD24^{hi}CD38^{low/-} en pacientes con LES¹². Las razones para este hallazgo se han explicado como una anomalía permanente en el porcentaje de células B de memoria CD27 IgD IgM de los pacientes con LES, además de ser un evento asociado al tratamiento inmunosupresor que reciben^{23,24}. Ahora bien, cabe resaltar que en el estudio del grupo de Blair dentro de sus resultados se muestra esta misma disminución en el porcentaje de células B de memoria¹².

La disminución en las células B de memoria también se ha descrito en pacientes con AR en tratamientos con anti-TNF²⁵. Pero es necesario aclarar que ninguno de los pacientes evaluados en este estudio recibía este tipo de tratamiento.

Terapias inmunosupresoras como el micofenolato se han asociado con cambios en las frecuencias de LB en pacientes con LES²⁶. Así mismo, se ha evidenciado una disminución significativa de células B de memoria CD27⁻ en pacientes con LES, la cual es explicada por largos periodos de inmunosupresión con medicamentos como la azatioprina y la prednisona^{27,28}. No obstante, la frecuencia aumentada de estas células se ha correlacionado positivamente con la actividad de la enfermedad y la presencia de ciertos autoanticuerpos (anti-dsDNA, anti-Smith, anti-RNP y anti-9G4)²⁸. Cabe resaltar que las cinéticas de la repoblación de LB debido a las terapias inmunosupresoras que reciben los pacientes altera las frecuencias de las subpoblaciones de LB en pacientes con LES, hecho que tal vez explica la reducción de la subpoblación de memoria en el grupo de pacientes con LES y con OEA que se analizaron en nuestro estudio.

En cuanto a la expresión de CD1d, se observó que entre las subpoblaciones de células B evaluadas, los LB transicionales CD24^{hi}CD38^{hi} tenían una expresión más alta de esta molécula, lo que concuerda con resultados previos¹².

En un estudio realizado en 2002 por Mizoguchi et al., se pudo evidenciar, en un modelo de colitis autoinmune experimental, que la regulación positiva de CD1d confería a las células B la capacidad de suprimir la progresión de la inflamación intestinal crónica, en ratones enfermos, por medio de un aumento en la producción de IL-10³. Entre los LB con capacidad reguladora, los más ampliamente estudiados son los B10, cuyo fenotipo es CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi} y han sido descritos como potentes productores de IL-10, con capacidad de regular diferentes respuestas inmunes en diferentes contextos patológicos, principalmente enfermedades autoinmunes

como AR, esclerosis múltiple, LES y colitis. Esta regulación es mediada principalmente por la IL-10 y depende de la presencia de múltiples moléculas como CD19, CD1d, CD40, CD80, CD86, MHC-II e IL-21R, induciendo una reducción en la frecuencia de LT de los perfiles pro-inflamatorios Th1 y Th17 y promoviendo la diferenciación de células T reguladoras^{6-8,18,29}.

Por esta razón, en este estudio se quiso evaluar la expresión de CD1d, como una explicación parcial de las alteraciones funcionales previamente reportadas en las células Breg CD24^{hi}CD38^{hi} de pacientes con LES. Sin embargo, nuestros resultados no demostraron diferencias ni en el porcentaje de células B maduras, de memoria o transicionales CD1d⁺, ni en la expresión de CD1d en las subpoblaciones de células B evaluadas entre pacientes y controles.

Es de notar que durante la elaboración de este manuscrito, Bosma et al., reportaron una disminución en la expresión de CD1d en células B totales de pacientes con LES comparados con controles sanos, además de defectos en su reciclaje. Sin embargo, en este estudio no se evaluó la expresión de CD1d en subpoblaciones de LB²⁰.

CD1d se encarga de presentar lípidos a células iNKT (por su sigla en inglés "Invariant Natural Killer T cells"), para las cuales se han descrito funciones reguladoras como la inhibición de producción de IL-17 e inducción del reclutamiento de células Treg³⁰. Al respecto se ha observado que los pacientes con LES presentan una reducción numérica de las células iNKT y que además son refractarias a la estimulación, lo que probablemente se explique por la deficiencia observada en la expresión de CD1d en células B, ya que se ha demostrado que estas células son necesarias para el mantenimiento del número y la función de las iNKT²⁰. Además, en este mismo estudio Bosma et al., pudieron observar una disminución en la expresión de CD1d en la subpoblación de LB inmaduros CD24^{hi}CD38^{hi}.

Dado que las células B CD24^{hi}CD38^{hi} son las que mayor expresión de CD1d presentan, es probable que esta subpoblación tenga un importante papel en la regulación ejercida sobre las células iNKT. Por esta razón la evaluación de la expresión de CD1d en esta subpoblación podría ayudar a entender mejor las alteraciones que se presentan en las células B reguladoras y en general en los mecanismos de tolerancia en el LES. Si bien en el presente estudio no se observaron diferencias en la expresión de CD1d en las células reguladoras CD24^{hi}CD38^{hi}, entre pacientes y controles, esto puede explicarse, al menos parcialmente, por el tamaño muestral, ya que en el estudio de Bosma se incluyó una cohorte de 254 pacientes, por lo cual el aumentar el número de pacientes y controles se presenta como una perspectiva en nuestra investigación. Además, el estudio de otros mecanismos reguladores como el ejercido por CD1d en las células B reguladoras, ayudará a entender la inmunopatología y a mejorar las alternativas terapéuticas no sólo en el lupus sino también en otras enfermedades en las que están implicadas estas células.

Conclusión

Finalmente, quedan por resolver múltiples aspectos de la biología de las células Breg en el humano y el modelo murino que permitan un mejor entendimiento de los mecanismos regula-

torios de estas células, así como la comprensión del papel que cumplen estas células en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes y su implicación en la etiología de enfermedades inflamatorias crónicas.

Financiación

Comité para el desarrollo de la Investigación (CODI) Universidad de Antioquia, proyecto E001600, menor cuantía. Programa Joven Investigador Universidad de Antioquia. Programa Sostenibilidad 2013-2014 Universidad de Antioquia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Grupo de Reumatología Universidad de Antioquia. Unidad de Citometría, Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia. Hospital Universitario San Vicente Fundación. Pacientes y controles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008;223:284-99.
2. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith RN, Preffer FI, Bhan AK. Suppressing role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med.* 1997;186:1749-56.
3. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d up regulation. *Immunity.* 2002;16:219-30.
4. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184:2271-8.
5. Carter NA, Rosser EC, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R32.
6. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* 2009;182:7459-72.
7. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28:639-50.
8. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Kuwano Y, Okochi H, Tamaki K, et al. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J Immunol.* 2010;184:4801-9.
9. Blair PA, Chávez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2009;182:3492-502.
10. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 2005;105:4390-8.
11. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol.* 2009;182:5982-93.
12. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32:129-40.
13. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;178:3447-56.
14. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature.* 2005;435:598-604.
15. Colgan SP, Hershberg RM, Furuta GT, Blumberg RS. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:13938-43.
16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-7.
17. Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, et al. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med.* 1993;86:447-58.
18. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol.* 2010;185:2240-52.
19. Haas KM, Watanabe R, Matsushita T, Nakashima H, Ishiura N, Okochi H, et al. Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Immunol.* 2010;184:4789-800.
20. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity.* 2012;36:477-90.
21. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117:530-41.
22. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19(+)/CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev.* 2012;11:670-7.
23. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Pérez-Venegas JJ, Rodríguez C, Brieva JA. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R108.
24. Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ, et al. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3044-56.

25. Anolik JH, Ravikumar R, Barnard J, Owen T, Almudevar A, Milner EC, et al. Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks. *J Immunol.* 2008;180:688-92.
26. Eickenberg S, Mickholz E, Jung E, Nofer JR, Pavenstadt HJ, Jacobi AM. Mycophenolic acid counteracts B cell proliferation and plasma blast formation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R110.
27. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1762-73.
28. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007;178:6624-33.
29. Yang M, Deng J, Liu Y, Ko KH, Wang X, Jiao Z, et al. IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. *Am J Pathol.* 2012;180:2375-85.
30. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004;114:1379-88.