

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Cuantificación y caracterización de subpoblaciones de linfocitos B en
pacientes con lupus de aparición pediátrica del Hospital Infantil del
Estado de Sonora



TESIS

Que para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Francisco Xavier Olmos García

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



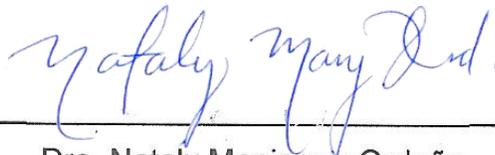
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



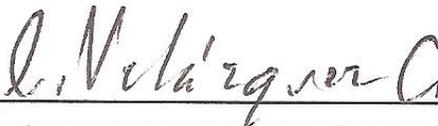
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Francisco Xavier Olmos García**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



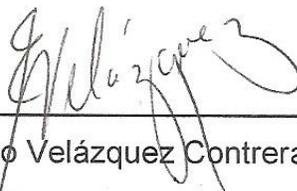
Dra. Nataly Manjarrez Orduño
Director Académico



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario/Co-Director



Dr. Norberto Sotelo Cruz
Vocal



Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras
Suplente

DEDICATORIA

A mi madre, a mi padre y a mi hermano, quienes me han apoyado a través de todos estos años de largo trabajo y estudio, motivándome cada día a seguir y alcanzar mis sueños y metas.

A Karla Alejandra Molina, por apoyarme y alentarme a seguir siempre mis metas y sueños y no rendirme aunque el camino sea difícil, por brindarme su cariño y compañía durante todo este proceso.

A la Dra. Nataly Manjarrez Orduño, quien durante estos dos años me apoyó y me motivo a ser cada vez mejor en lo que hago, de quien aprendí innumerable número de lecciones, quien sin conocerme decidió apoyarme y ayudarme para conseguir mis metas. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, por todo su apoyo y de quien aprendí mucho, ayudándome a ser la persona que hoy soy.

A la Dra. Luz María Suárez Larios, por todo su apoyo en este proyecto, ya que sin su ayuda ninguno de estos resultados hubieran sido posibles.

Al Dr. Norberto Sotelo Cruz, por toda su ayuda y todos sus aprendizajes a lo largo de estos dos años de estudios.

Al Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras, por toda su ayuda y consejos.

A la M.C. Lucila Rascón Duran, por todo su apoyo y consejos, por contagiarnos siempre esa alegría día a día que la caracteriza tanto.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular, la M.C. Alejandra Valdez, la cDr. Gloria López, la cDr. Paola Gastélum, el cDr. Efraín Alday, al M.C. Samuel Alday, la QBC Brenda Samaniego, al pQBC Raúl Rascón, la pQBC Thania Garzón, al pQBC Víctor Domínguez, la Biol. Lourdes Valencia, la Dra. Jael Quintero y la Med. Elia Salazar, por todo su apoyo, sus ánimos y sus consejos, con quienes me toco compartir este camino, y aseguro no podría haber elegido mejores.

A la M.C. Judith Valdez y a la unidad de Citometría de flujo de la Universidad de Sonora, ya que sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Valdenebro y los médicos y enfermeras del servicio de consulta externa del Hospital Infantil del Estado de Sonora, ya que sin su apoyo este proyecto no hubiera sido posible.

A todos los pacientes adultos y pediátricos que participaron en este proyecto, ayudando a aportar su granito al avance de la ciencia médica.

A mis amigos, Alan Romandia, Saúl Gutiérrez, Javier Castillo, Alan Bustamante, Adrián Romandia, Nagai Delgado, Daniel Delgado, Eduardo Molina, Martin Reséndiz, Felipe Ramírez, Iván Ferra, por la compañía y apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mi familia, mis tías, tíos, mis primas y primos, por todo el apoyo y cariño que me brindan.

A mi prima María Eugenia Estrada, quien siempre estuvo a mi lado para brindarme su apoyo y su compañía, quien recorrió todo este camino conmigo.

Al CONACyT, por impulsar y apoyar a los jóvenes deseosos de aportar su granito de arena a ciencia y tecnología, y con esto crear un mejor país.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
OBJETIVOS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Lupus Eritematoso Sistémico.....	3
Manifestaciones Clínicas, Diagnóstico y Tratamiento...	4
Factores de Riesgo.....	6
Fisiopatología.....	7
Lupus Eritematoso Sistémico en la Edad Pediátrica.....	8
Linfocitos B.....	9
Origen y Maduración.....	9
Tolerancia central y Periférica.....	12
Activación y Memoria.....	14
Linfocitos B en Lupus Eritematoso Sistémico.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Consideraciones Bioéticas.....	18
Inclusión de los Sujetos de Estudio.....	18
Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica....	19

Tinción para Subpoblaciones de Linfocitos B.....	19
Tinción para Subpoblaciones de Células T.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Caracterización de las Subpoblaciones de Linfocitos B.....	22
Cuantificación de Linfocitos B Vírgenes IgM Negativas.....	30
Cuantificación de Linfocitos B de Memoria IgM.....	34
Caracterización de subpoblaciones de Células T.....	36
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Criterios revisados de la clasificación de Lupus Eritematoso Sistémico (ACR).....	5
II	Datos clínicos de los pacientes con LES pediátrico de este estudio.....	20
III	Frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con LES, pacientes con AJI, controles pediátricos sanos y controles adultos sanos.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Subpoblaciones de linfocitos B descritas en humanos.....	23
2	Selección de diferentes subpoblaciones de linfocitos B.....	25
3	Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en los diferentes grupos de estudio.....	26
4	Gráfica de subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes con lupus pediátrico vs control pediátrico sano.....	28
5	Gráfica de subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes con lupus pediátrico vs control adulto sano.....	29
6	Gráfica de subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes con lupus pediátrico vs pacientes con artritis juvenil idiopática.....	31
7	Selección de las subpoblaciones de linfocitos B que expresan IgM.....	33
8	Proporción de linfocitos B vírgenes IgM negativas en diferentes grupos de estudio.....	34
9	Proporción de linfocitos B de memoria IgM positivas IgD positivas en diferentes grupos de estudio.....	35
10	Proporción de diferentes subpoblaciones de células T en diferentes grupos de estudio.....	37

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar y cuantificar las subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con lupus de aparición pediátrica del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Objetivos Particulares

- Caracterizar las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con lupus de aparición pediátrica y compararlo contra las subpoblaciones de linfocitos B en controles sanos.
- Comparar las subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con lupus de aparición pediátrica contra pacientes con artritis juvenil idiopática.

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos y por el depósito de éstos en tejido. La mayoría de los casos de lupus aparecen en mujeres en edad fértil y menos del 10% de los casos de lupus aparecen durante la infancia. Los auto-anticuerpos son producidos por los linfocitos B autorreactivos, por lo que en este trabajo se caracterizaron las subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de pacientes con LES de aparición pediátrica mediante citometría de flujo. Las subpoblaciones estudiadas fueron: linfocitos B transicionales (IgD+,CD27-CD10+,CD38+), vírgenes (IgD+,CD27-), de memoria sin cambio de isotipo (SCI) (IgD+,CD27+) y memoria con cambio de isotipo (IgD-,CD27+). Además se cuantificaron los porcentajes de células IgM negativas en la subpoblación de linfocitos B vírgenes y la fracción de células de memoria sin cambio de isotipo IgM+ IgD+. Se encontró una disminución en la subpoblación de linfocitos B vírgenes IgM negativos, conocidas como linfocitos B en estado de anergia, en los pacientes con LES comparado con sus controles, pudiendo pensarse en un fallo en los mecanismos de tolerancia periférica. Este hallazgo sugiere que la fisiopatología del lupus pediátrico es al menos parcialmente diferente de lo que se conoce en el LES adulto.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus tipo I (DM1), entre otras, constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por el daño a tejido propio por el sistema inmunológico. Estas suelen ser de carácter crónico-inflamatorio y en su mayoría principalmente afectan a mujeres (Duró, 2010).

El LES es una enfermedad caracterizada principalmente por la presencia de auto-anticuerpos, principalmente de tipo antinuclear y por el depósito de éstos en tejido. Aparece principalmente en mujeres en edad reproductiva, predominando en hispanos, nativos americanos, personas con ascendencia africana y del sudeste y sur de Asia. Se manifiesta como daño a diferentes órganos y sistemas con síntomas y signos muy poco específicos. (Enríquez-Mejía, 2013). Su aparición se considera multifactorial, con factores extrínsecos (exposición a radiación U.V., algunas infecciones, diferentes fármacos, etc.) e intrínsecos (predisposición genética, hormonas, entre otros) (Castillejo-López y col., 2012; Manson e Isenberg, 2003).

Un 20 al 30% de los pacientes con LES tienen manifestaciones durante la primera o segunda década de la vida (Caggiani y Gazzara, 2003), considerándose como LES de aparición pediátrica. Se ha reportado que la predominancia de género masculino: femenino 9:1 observada en la etapa adulta cambia a 4:3 cuando el inicio es en la primera década de la vida y 4:1 en la segunda década, disminuyendo a una relación 5:1 cuando el inicio es después de los 50 años (Danchenko y col., 2006; McCarty y col., 1995). La edad promedio de diagnóstico de LES en pacientes pediátricos es de 12 años, aunque se han reportado casos en menores de 2 años. En un estudio realizado en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, que abarcó los años de 1979 a 2005, se reportó un caso de paciente pediátrico con lupus por cada 5000 egresos y una mortalidad de casi el 20% (Sotelo y col., 2006).

La fisiopatología del lupus es compleja e incluye múltiples presentaciones de la enfermedad. En general, se trata de un desorden del sistema inmunológico en el que hay múltiples procesos fuera de control, empezando con mediadores solubles y problemas en células de la respuesta inmune innata. Sin embargo, como todas las enfermedades autoinmunes, hay una pérdida de tolerancia en los mecanismos adaptativos, es decir, los linfocitos. (Clark y Reichlin en 1969; Koffler y col., 1967; Hahn, 1998; Enríquez-Mejía, 2013). Los mecanismos fisiopatológicos específicos de la presentación pediátrica de esta enfermedad se conocen en poco detalle, aunque se sabe que hay una mayor contribución de factores genéticos (Chang, 2013). Además, en términos generales se sigue el mismo protocolo para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad que en los pacientes adultos.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos, tanto B como T, están afectados en el LES. De estos, los linfocitos B son una parte crítica, al ser las células que dan origen a los auto-anticuerpos que causan el daño tisular. En LES, se ha descrito como el proceso de maduración de los linfocitos B está afectado, llevando a la generación una mayor proporción de linfocitos B auto-reactivos que en los sujetos sanos. Además, también se ha observado como hay una mayor proporción de células auto-reactivas en los compartimentos de linfocitos B de memoria de los pacientes con lupus (Manjarrez Orduño y col., 2009). En los sujetos pediátricos, el sistema inmune aún está madurando, esto incluye la generación de las células vírgenes y de memoria, por lo que nuestra pregunta principal es como se ve afectada la maduración y diferenciación de las linfocitos B en los pacientes pediátricos con LES.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Lupus Eritematoso Sistémico

Las enfermedades autoinmunes son un grupo heterogéneo de enfermedades en las que el sistema inmunológico pierde la homeostasis causando daño al propio organismo a diferentes niveles. En su mayoría, los agentes del daño son células y mecanismos del brazo adaptativo del sistema inmune, en contraste con los fenómenos inflamatorios donde el principal mecanismo patológico son las células y mecanismos innatos. Las enfermedades autoinmunes, entre las que se encuentran el lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (RA), diabetes mellitus tipo 1 (DM1), entre otras, se diferencian entre sí, en cuanto a órganos o sistemas que atacan y los mecanismos y células más involucrados. Por ejemplo, en la DM1, los linfocitos T citotóxicas son el principal mecanismo patológico, y las células beta pancreáticas el principal blanco.

El LES es una enfermedad con manifestaciones sistémicas, poco específicas que incluyen artralgias, cansancio y fiebre. Los principales hallazgos del laboratorio incluyen la presencia de auto-anticuerpos, principalmente contra antígenos nucleares, incluyendo DNA e histonas, y riboproteínas (Hahn, 1998). La patología es causada principalmente por el depósito de complejos antígeno anticuerpo en los tejidos, principalmente articulaciones, riñones y vasos sanguíneos (Enríquez-Mejía, 2013).

El LES es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva con una proporción 1:9. (Enríquez Mejía, 2013). La incidencia del LES varía de forma importante en diferentes grupos étnicos y poblacionales, con tasas de incidencia anual en adultos que oscilan entre 1.9 y 5.6 por cada 100,000 habitantes, aunque resulta difícil establecer una prevalencia debido a las diferencias en reportes epidemiológicos entre múltiples países (Benseler y Silverman, 2007; Danchenko y col., 2006).

Manifestaciones Clínicas, Diagnóstico y Tratamiento

El LES, se caracteriza por presentar síntomas y signos muy poco específicos, los cuales no dan indicios de una patología clara, por lo que es necesario realizar una historia clínica detallada y una exploración física cuidadosa además una batería completa de pruebas de laboratorio.

Algunas de las manifestaciones comunes en ésta enfermedad son: fatiga, cambios de peso inexplicable y la fiebre prolongada sin que exista proceso infeccioso demostrable. También existen manifestaciones de inflamación poco específicas: rigidez articular en los dedos de las manos, muñecas, codos, rodillas y dedos de los pies, dolor muscular en brazos y piernas, eritema malar (eritema en alas de mariposa), aunque también es común encontrarlo en otras partes del cuerpo.

En estados avanzados se presentan manifestaciones cardíacas y pulmonares (pericarditis y pleuritis: dolor en tórax y a veces fiebre), manifestaciones renales (nefropatía lúpica), edema, hipertensión arterial, entre otras (Pérez y col., 2005).

El diagnóstico del LES es complicado, debido principalmente a los hallazgos poco específicos que se presentan en ésta enfermedad (Malleon y Tekano, 2013). El Colegio Americano de Reumatología (ACR) ha establecido criterios clínicos generales para la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de LES (Tabla I). Entre éstos se encuentran parámetros tanto clínicos como de laboratorio enfocados principalmente a las manifestaciones y síntomas más específicos que se encuentran en esta patología, donde si cuatro o más criterios son positivos, se debe considerar como sospecha de LES (Hochberg, 1997).

Tabla I. Criterios revisados de la clasificación de Lupus Eritematoso Sistémico (ACR).

-
- 1. Eritema malar:** eritema fijo, plano o elevado, sobre las prominencias malares, sin afectación de los pliegues nasolabiales
2. Erupción discoide: placas eritematosas elevadas con descamación

queratótica adherente; cicatrización atrófica puede ocurrir en lesiones antiguas

3. Fotosensibilidad: erupción cutánea como resultado de una reacción inusual a los rayos solares, por historia u observación del médico

4. Úlceras orales: ulceración oral o nasofaríngea, usualmente indolora, observada por el médico

5. Artritis: no erosiva, involucrando a 2 articulaciones periféricas o más, caracterizada por dolor, tumefacción o derrame

6. Serositis

a) Pleuritis: historia de dolor pleurítico, roce auscultado por el médico o evidencia de derrame pleural

b) Pericarditis: documentada por electrocardiograma, roce o evidencia de derrame pericárdico

7. Alteraciones renales

a) Proteinuria de más de 0,5 g/24 h o 3+, persistente

b) Cilindros celulares: glóbulos rojos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos

8. Afectación neurológica

a) Convulsiones: en ausencia de medicamentos ofensivos o de alteración metabólica

b) Psicosis: en ausencia de medicamentos ofensivos o de alteración metabólica

9. Alteración hematológica

a) Anemia hemolítica

b) Leucopenia inferior a 4,000 cel/ml en dos o más ocasiones

c) Linfopenia inferior a 1,500 cel/ml en dos o más ocasiones

d) Trombocitopenia inferior a 100,000 cel/ml en ausencia de fármacos expeditivos

10. Alteración inmunológica

a) Anticuerpo anti-ADN elevado

b) Anticuerpo anti-Smith positivo

c) Hallazgos positivos de anticuerpos antifosfolípidos basado en:

– Anticardiolipinas IgG/IgM

– Anticoagulante lúpico

– Prueba serológica de sífilis falsa positiva, presente como mínimo durante 6 meses

11. Anticuerpo antinuclear en valores elevados

El tratamiento del LES consiste principalmente en inmunosupresores como glucocorticoides, los cuales tienen rápido impacto sobre las exacerbaciones de la enfermedad. La metilprednisona se ha usado para tratar con éxito la afectación de órganos vitales y cierta manifestación es que conllevan una elevada mortalidad. La hidroxicloroquina, un medicamento utilizado inicialmente como un antipalúdico es efectiva para tratar manifestaciones más leves y mejoran la densidad ósea y la dislipo-proteinemia (Benseler y Silverman, 2007). La ciclofosfamida y otros agentes citotóxicos son parte de primera línea de tratamiento para la afectación de órganos vitales (Borba y Bonfa, 2001). También es muy importantes la educación del paciente, la protección contra los rayos ultravioletas, el tratamiento y la prevención de las infecciones y el tratamiento de otras complicaciones como la osteoporosis (Cassidy y Petty, 2001). El tratamiento del LES ha ido avanzando con el tiempo, ya que la supervivencia a 4 años en 1950 era del 50%, ahora se alcanza un 80% a los 15 años (Mason e Isenberg, 2005). Aun así un paciente que es diagnosticado a los 20 años de edad, tiene de 1 a 6 oportunidades más de morir a los 35 años, que un individuo sano ya sea por lupus en sí mismo o infección (Mason e Isenberg, 2005).

Factores de Riesgo

El LES es una enfermedad compleja, multifactorial. Los factores intrínsecos son principalmente genéticos y hormonales. Mientras que los factores extrínsecos incluyen infecciones, exposición a toxinas y ciertos medicamentos (Tsao Betty y Hui Wu, 2007).

En términos genéticos, del 10 al 12 % de los pacientes con lupus tiene un familiar en primer grado con lupus. Entre los factores genéticos que han sido elucidados se encuentran algunos haplotipos del HLA. Además variantes en genes relacionados con la activación de linfocitos, la apoptosis, el sistema de

complemento y la inmunidad innata. Hasta junio del 2015, estudios de asociación genómica habían reportado más de 30 variantes genéticas asociadas a un mayor riesgo a desarrollar lupus (Castillejo-López y col., 2012; Manson e Isenberg, 2003; immunobase.org).

En términos hormonales, las hormonas estrogénicas interfieren de manera directa con el proceso de activación de los linfocitos y juegan un rol importante en la fisiología de las células productoras de citocinas, que inhiben a las células T reguladoras (Stimpson, 1988; Vertheil y col., 2001).

Entre los factores extrínsecos que predisponen a esta enfermedad, se encuentra el daño por exposición a la radiación ultravioleta. (Barbhaya y Costenbader, 2014), el uso o la exposición a algunos fármacos, incluyendo antimicobacterianos como la isoniazida, la hidralazina y la procainamida, algunos anticonvulsivos, y algunos anticonceptivos orales (Jain, 1991). Además algunas infecciones como faringitis de repetición posiblemente interactúan con el hospedero genéticamente susceptible y pueden desencadenar la enfermedad (Zonana y col, 2002).

Fisiopatología

La fisiopatología del LES es compleja, y en principio se centró en entender los mecanismos de daño tisular mediado por autoanticuerpos. Se sabe que los anticuerpos anti-DNA de doble cadena, se asocian con nefritis lúpica, mientras que los anticuerpos anti-Ro y anti-La (que reconocen pequeños complejos ribonucleoprotéicos que localizados en el núcleo y el citoplasma) se asocian a formas fotosensitivas de lupus y a síndrome de Sjögren.

Los auto-anticuerpos son generados por linfocitos B auto-reactivos, que serán tratadas a detalle más adelante. Resulta importante señalar aquí que la mayoría de las personas sanas tienen en su suero anticuerpos de tipo IgM que reconocen DNA de una sola cadena: estos son autoanticuerpos naturales

presentes en todas las personas con poco potencial patológico. Por el contrario los anticuerpos IgG anti-DNA de doble cadena de los pacientes lúpicos no suelen estar presentes en los individuos sanos, y muestran una alta afinidad hacia el DNA y otros antígenos, además de ser capaces de fijar moléculas del complemento. Estructuralmente hablando, estos autoanticuerpos tienen múltiples cargas positivas en su región de reconocimiento al antígeno, lo que los hace complementarios al DNA, que tiene carga negativa (Clark y Reichlin, 1969; Koffler y col., 1967; Hahn, 1998; Enríquez-Mejía, 2013).

Además de los autoanticuerpos, y los linfocitos B asociados, uno de los principales mecanismos patológicos en LES son los interferones tipo I. Aproximadamente 40% de los pacientes con LES presentan expresión de genes de respuesta a INF- α , algo que se conoce como “señal de interferon” y que pone en manifiesto que el organismo está sometido a un proceso inflamatorio que va mucho más allá de la producción de autoanticuerpos (Baechler y col., 2003; Obermoser y Pascual, 2010). Por una parte el INF- α estimula la producción de anticuerpos en los linfocitos B; por otra parte, los complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en diferentes órganos y tejidos, pueden inducir la producción de ésta citocinas, creándose un ciclo patológico (Bennett y col., 2003).

Otros mecanismos asociado a la patología del LES, son las células T reguladoras, que son las encargadas de controlar y suprimir la respuesta exacerbada del sistema inmunológico. Estas células se han reportado reducidas tanto en número como en función en diferentes enfermedades autoinmunes (La Cava, 2008).

Lupus Eritematoso Sistémico en la Edad Pediátrica

El entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos del LES es aun limitado, y se conoce aún menos sobre lo que ocurre en la presentación pediátrica de esta

enfermedad. Sin embargo se sigue el mismo protocolo para el diagnóstico, tratamiento y control subsecuente de la enfermedad que en los pacientes adultos.

El diagnóstico promedio de esta enfermedad en pacientes pediátricos es de 12 años, sin embargo se han reportado casos en menores de 2 años. En Sonora, se ha reportado un caso de paciente con lupus por cada 5000 egresos en el HIES y una mortalidad de casi el 20% (Sotelo y col., 2006). El lapso entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico de la enfermedad es muy variado, desde un mes hasta incluso 3 años (con una media de 4 meses). En éstos pacientes la enfermedad suele ser más severa que en sus contrapartes adultos, y encuentra principalmente manifestaciones de tipo nefrológicas (nefropatía en un 90%, con formas histopatológicas severas), neurológicas, respiratorias, cardiovasculares y hematológicas (Caggiani y Gazzara, 2003).

La idea de que “los niños no son adultos pequeños” tiene raíces en el pensamiento intelectual y este concepto también es válido en biología (Davis, 2013). En los pacientes pediátricos con enfermedades autoinmunes en general, y LES en particular, resulta importante considerar que el sistema inmunológico aún se encuentra en proceso de maduración al mismo tiempo que aparece la patología. Este hecho tiene implicaciones en términos de mecanismos patológicos. Los linfocitos B, que dan origen a las células productoras de anticuerpos, son el foco de este trabajo, y a continuación se explicará su biología y su contribución a la patología del lupus.

Linfocitos B

Origen y Maduración

El sistema inmunológico está conformado por un gran repertorio de células y moléculas encargadas de defender al organismo contra diversos patógenos. Entre este repertorio inmunológico se encuentra un grupo de células que juegan

un papel muy importante en la defensa del hospedero, llamados linfocitos. Los linfocitos son células del sistema inmune con la capacidad de diferenciarse a células de memoria, y por lo tanto, de montar respuestas inmunológicas más rápidas y eficientes contra patógenos. Entre los linfocitos encontramos dos tipos con características y funciones muy diferentes, los linfocitos T y los linfocitos B.

Los linfocitos B, también llamados células B, se caracterizan por expresar el receptor de células B (RCB), el cual está compuesto de una inmunoglobulina anclada a la membrana de las células, la cual reconoce antígenos específicos, y por dos proteínas asociadas, que transducen la señal. Además expresan receptores de tipo toll (RTT), con el cuál reconocen patrones moleculares de diferentes patógenos. También participan como células presentadora de antígeno, por lo que expresan complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase II, con el cuál le presentan antígenos procesados a las células T, con el fin de desencadenar una respuesta inmune más avanzada y específica (Kilmon y col., 2005).

Estas células tienen su origen en medula ósea, donde maduran junto con otro grupo variado de células hematológicas, de un precursor común llamado célula pluripotencial hematopoyética, la cual se caracteriza por la expresión de CD34 (Ramírez y col 2010). Posteriormente y gracias a la presencia de diferentes citocinas producidas por células del estroma encargadas del desarrollo y maduración de todas estas poblaciones celulares, la célula madre puede madurar hacia precursor linfocitario común, la cual puede dar origen a linfocitos T, B o NK, dependiendo de los estímulos que esta reciba. Si el linaje sigue hacia célula B, esta madurará a célula pro-B donde se recombinan los genes que darán lugar a la cadena pesada del RCB. La expresión en membrana de las cadenas pesadas, acopladas a la cadena subrogada (VpreB y lambda 5), junto con los co-receptores Ig- α e Ig- β marca el inicio del estadio de célula pre-B, donde se recombinan los genes que darán lugar a las cadenas ligeras del RCB. En el momento en el que la célula B expresa su receptor de

antígeno completo con sus co-receptores, se le conoce como célula B inmadura. En este punto se evalúa su tolerancia a lo propio, mediante un mecanismo conocido como selección negativa, en el cuál si el linfocito B reconoce un antígeno propio, se induce un mecanismo de tolerancia, los cuales son: eliminación de la clona auto-reactiva, edición del receptor y anergia. Si la célula B inmadura no reconoce al antígeno, o hay un pobre entrecruzamiento, abandona la médula ósea y sale a sangre periférica donde se le llama célula B transicional (Paus y col., 2006).

Una vez en sangre periférica, la célula B transicional se dirigirá al bazo, en donde finalizará su proceso de maduración. En la primera etapa de célula B transicional hay una pobre expresión de IgD. Debido a esto podemos dividir a los linfocitos B transicionales en dos subtipos, los que expresan poco IgD, conocidas como linfocitos B transicionales T1, que expresan altos niveles de IgD, conocidos como linfocitos B transicionales T2 (Carsetti y col., 2004; Loder y col., 1999; Carsetti y col., 1995).

Una vez que ocurre el proceso de maduración de los linfocitos B transicionales en bazo, éstas dan lugar a los linfocitos B vírgenes que salen a circulación en sangre periférica. Éstos son caracterizados por la expresión de IgD e IgM de membrana, y por no expresar CD27 (marcador de linfocitos B de memoria), además expresan el transportador de membrana ABC. Los linfocitos B vírgenes corresponden al 40-60% de todos los linfocitos B en circulación y también se encuentran en bazo y nódulos linfáticos. Éstos permanecerán como linfocitos B vírgenes hasta el momento en que se encuentren con su antígeno y ocurra un proceso de proliferación y diferenciación hacia célula plasmática productora de anticuerpos o célula B de memoria (Wirhth y Lanzavecchia, 2005; Weller y col., 2004).

Tolerancia Central y Periférica

Como ya se mencionó anteriormente, durante el desarrollo y maduración de los linfocitos B pueden aparecer clonas auto-reactivas, llevando consigo una pérdida de la tolerancia a lo propio, lo que en situaciones extremas culmina en el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Los mecanismos de tolerancia central están ligados a proceso de maduración de los linfocitos B.

Los primeros estadios de maduración de los linfocitos B se llevan a cabo en medula ósea. En este sitio, una vez que los linfocitos B expresan el RCB completo (IgM y co-receptores $ig-\alpha$ e $ig-\beta$), el entrecruzamiento del RCB activa los mecanismos de tolerancia en los linfocitos B inmaduras o transicionales. Existen tres tipos de mecanismos de inducción de tolerancia de linfocitos B: la edición del receptor, anergia y la eliminación de la clona. A la evaluación de la tolerancia en este punto se le conoce como tolerancia central (Kilmon y col., 2007).

En medula ósea, si los linfocitos B inmaduros se encuentran con un auto-antígeno y el entrecruzamiento del RCB es alto, es decir hay un fuerte reconocimiento de ese auto-antígeno, se induce edición del receptor. Esto es un reordenamiento de los genes que forman la región de reconocimiento de antígeno de las cadenas pesadas y ligeras de la IgM del RCB. Si posterior a esto los linfocitos B reconocen débilmente o nulamente el autoantígeno, ésta sale a sangre periférica y continúa con su proceso de maduración; si tras la edición del receptor la clona aun es auto-reactiva, es decir, si existe un alto reconocimiento al autoantígeno y al editar el receptor no se soluciona este problema, se elimina la clona mediante apoptosis. Para esto juegan un papel muy importante las vías de Fas y de Bcl-2, por ser dos de las principales vías involucradas en llevar a la célula a apoptosis. La eliminación de clonas por apoptosis fue el primer mecanismo de tolerancia descrito para los linfocitos B (Goodnow, 1992).

Otro mecanismo de regulación de la tolerancia es el mecanismo de anergia. Éste se conoce como un estado de hiporespuesta que se induce en los linfocitos B inmaduros que presentan un grado intermedio de entrecruzamiento del RCB. En estas células hay una disminución de la expresión del RCB y de las señales de activación. Las células que se encuentran en estado de anergia, presentan una vida media corta (Ashkenaz y col., 1998; Garrone y col., 1995; Paus y col., 2006). Estos mecanismos de anergia fueron descritos principalmente en modelos animales; los ejemplos en humanos han sido encontrados recientemente, por ejemplo en una subpoblación de linfocitos B autorreactivos vírgenes B (Naive IgD⁺ IgM⁻) que expresan bajos niveles de IgM de membrana, una disminución en el flujo de calcio y pobre fosforilación de tirosinas tras la estimulación del BCR en estas células (Duty y col. 2009). Estas células forman aproximadamente el 2.5% de linfocitos B totales en sangre periférica. La IgM en estas células sí se sintetiza, más no se expresa en membrana, ya que se encontró dentro del citoplasma de éstas células y fenotípicamente se describieron por una ausencia de marcadores de activación, reducción en moléculas co-estimuladoras como CD19 y CD21 e incremento en moléculas inhibitoras como CD22. Funcionalmente estas células demostraron una débil proliferación, deterioro en la diferenciación y una pobre producción de anticuerpos (Quách, y col., 2014).

Aproximadamente un 20% de células autorreactivas logran escapar a estos mecanismos de tolerancia, y salen a sangre periférica (Wardemann y col., 2003). También existen células que generan autorreactividad ya maduras durante el proceso de hipermutación somática. No se sabe a ciencia cierta como ocurre esto, pero se sospecha que la célula reconoce moléculas de diferentes patógenos muy similares a moléculas del mismo organismo, con esto la célula B genera respuesta contra esta molécula propia. A esto se le llama mimetismo molecular. (Parijs y col., 1998;).

Esta descrito que la tolerancia central de la célula B es principalmente controlada por factores intrínsecos de ésta, que regulan la señalización del RCB y el RTT, mientras que la tolerancia periférica envuelve factores extrínsecos de la célula B como lo es la regulación por células T reguladoras y factores de activación como el BAFF (Meffre, 2011).

Activación y Memoria

Posterior al proceso de maduración, los linfocitos B vírgenes circulan por sangre periférica y órganos linfoides hasta el momento en que encuentran a su antígeno específico. Esto lleva a la activación y proliferación, con el fin de crear una respuesta en contra de ese antígeno.

En este proceso, el entrecruzamiento del RCB activa la endocitosis del antígeno. Dentro de las células B, el antígeno se procesa y ensambla al CPH previamente sintetizado y se expresa el CPH-antígeno en la membrana de la célula. La célula B activada por el antígeno se lo presenta por medio del CPH a la célula T cooperadora. La célula B y la célula T interaccionan a través del receptor de célula T (RCT) y el CPH y diferentes moléculas co-estimuladoras como el CD80, CD86, y CD40 de la célula B y el CD28 y CD40L de la célula T. A este proceso se le conoce como sinapsis inmunológica. Todas estas moléculas son indispensables para transducir la señal, la cual hará que la célula T produzca y libere diferentes citocinas, las cuales pueden incluir IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e interferon- γ (INF- γ). Estas citocinas brindarán co-estimulación a la célula B que la ayudarán a madurar y diferenciarse. Si la célula B tiene alta afinidad por el antígeno, posterior a esta estimulación, la célula B madurara a célula plasmática secretora de IgG o IgM sin mutación somática. Si la afinidad de la célula B es baja o intermedia, ésta viajará hasta la zona de célula T del folículo, para iniciar el proceso de creación de un centro germinal. En estos centros germinales, los linfocitos B interaccionarán con

células T específicas de tipo cooperador, conocidas como células T cooperadoras foliculares y con células dendríticas foliculares. La interacción con estas células T en esta área estimulará a los linfocitos B a hacer un cambio de isotipo (IgE o IgG), maduración de la afinidad a través del proceso de hipermutación somática, la cual consiste en un re-arreglo de genes que modifican la estructura de la inmunoglobulina, y maduración hacia célula plasmática de vida larga o célula B de memoria (Huppa y Davis, 2003).

La interacción CD40-CD40L favorece la aparición de células de memoria. Éstas se caracterizan por presentar un cambio de isotipo, hipermutación somática y expresión de CD27. Los linfocitos B de memoria circulan a través de todo el cuerpo en un estado de reposo, hasta el momento en que se vuelven a encontrar con su antígeno, donde desencadenaran una respuesta inmune secundaria de alta afinidad, más rápida y que no requiere algunos mediadores como IL-2 e IL-5. Al igual que la célula B virgen, la célula B de memoria endocita el antígeno a través del RCB y lo procesa para presentarlo posteriormente a la célula T a través del CPH. (Maruyama y col., 2000; Bernasconi y col., Bachmann y col., 2002; y col., 1996).

Existe una subpoblación de linfocitos B en humanos, los cuales expresan el marcador de células de memoria CD27, pero que no realizan cambio de isotipo y expresan IgD e IgM. Éstos son llamadas linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (*unswitched memory B cell*, en inglés) o linfocitos B parecidas a zona marginal (*marginal zone-like B cell*, en inglés), debido a su semejanza fenotípica con la población de células de zona marginal de ratón (Weller y col., 2004; Carsetti y col., 2005). Se desconoce si los linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo son una población que ha sido activada en forma específica, o si son parte de la inmunidad natural (Zinkernagel y cols, 2000).

Todo el proceso de maduración de los linfocitos B culmina en la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Éstas se

caracterizan por la pérdida de expresión de algunos marcadores como las inmunoglobulinas de superficie, el CPH y el CD20. Morfológicamente se caracterizan por presentar un gran citoplasma y un retículo endoplasmático muy activo, debido a que se encuentran en un proceso de síntesis constante de moléculas de anticuerpo. Cuando la célula B madura a célula plasmática, ésta se dirige hacia el tejido linfoide secundario o a la médula ósea donde finalizará su proceso de maduración. Las células plasmáticas tienen un tiempo de vida variado, puede ser de días en las células plasmáticas que se encuentran en zonas extra foliculares o de años en las células plasmáticas que migran a médula ósea (Slifka y Ahmed, 1998).

Linfocitos B en Lupus Eritematoso Sistémico

Históricamente, los linfocitos B son las células más asociadas con LES debido a que producen los autoanticuerpos que caracterizan la enfermedad. Más recientemente se ha puesto en evidencia que estas células también participan en la fisiopatología del lupus por sus funciones de presentación de antígeno y producción de citocinas. Esto hace que muchos agentes terapéuticos en lupus sean dirigidos principalmente contra las células B, sin embargo el tema se encuentra aún en discusión (Sfikakis y col., 2005; P Ng y col., 2007).

Dentro de los aspectos específicamente ligados a los linfocitos B que incrementan la susceptibilidad a LES, se encuentran aquellos que impactan la transducción de señales a partir del RCB, puesto que afectan tanto los mecanismos de tolerancia central durante la maduración, como la respuesta a antígenos durante la activación. Esto ha quedado claro por el incremento en susceptibilidad al lupus en personas con polimorfismos en genes que codifican para proteínas que participan en la señalización del RCB como *BANK1*, del cual su sobre-expresión se ha asociado fuertemente al lupus, algunos polimorfismos

del gen *CSK*, *BLK* y otros (Doreau y col., 2009; Kozyrev y col., 2008; Manjarrez-Orduño y col., 2012).

En pacientes con lupus, se ha reportado una falla en los mecanismos de tolerancia de los linfocitos B, llevando a un incremento en la generación de clonas autorreactivas de linfocitos B, las cuales producirán auto-anticuerpos (Meffre, 2011). Se han reportado además el incremento en las células transicionales en sangre periférica de pacientes con LES, un incremento en una población recientemente estudiada conocida como linfocitos B de memoria CD27 negativas, y una subpoblación en estado de anergia clasificada como linfocitos B vírgenes que expresan bajos niveles de IgM, con pobre proliferación y escasa activación (Wei y col., 2007; Quach y col., 2011; Carsetti y col., 1995).

La heterogeneidad del LES dificulta su entendimiento, y es muy poco lo que se conoce sobre pacientes pediátricos con LES. Se desconoce qué pasa con los linfocitos B en los pacientes pediátricos, donde las células de memoria apenas se empiezan a desarrollar. Por otra parte, el proceso de maduración de los linfocitos B hace que haya una mayor fracción de linfocitos B transicionales en circulación, comparado contra controles adultos sanos, pero se desconoce si este hecho se encuentra afectado en lupus o si hay aún más células transicionales que en los sujetos sanos. Es por todo esto que se debe insistir en estudiar con mayor detalle a los pacientes pediátricos que presentan LES y deben tomarse medidas específicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones Bioéticas

Este estudio se aprobó por el Comité de Bioética de la Secretaría de Salud, del cual depende el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), y por la Comisión de Bioética en Investigación de la Universidad de Sonora.

Se aplicó un consentimiento informado por escrito a los sujetos de estudio, y a los tutores de los sujetos menores de edad, donde se explicaba en qué consistía el proyecto, y para qué fines y como se utilizaría su muestra. Además en éste se hacía mención de que no se aplicaría ningún medicamento experimental, el estudio no presentaría un costo extra, los datos recolectados serían confidenciales (se utilizó una clave de identificación para cada paciente) y en caso de presentar inconformidad el paciente podría abandonar el estudio en cualquier momento. Una copia del consentimiento firmado quedó en el historial médico de cada sujeto incluido, otra copia en el archivo del proyecto y una última copia se le entregó a cada sujeto.

Inclusión de los Sujetos de Estudio

Se incluyeron un total de 24 sujetos de estudio, de los cuales seis fueron pacientes pediátricos con diagnóstico de LES que asistían al servicio de medicina interna del HIES; seis controles pediátricos sin enfermedad autoinmune o infecciosa, los cuales fueron sujetos pediátricos que acudían a la consulta externa del HIES, y fueron previamente valorados por un médico antes de su inclusión; seis controles adultos sin enfermedad autoinmune o infecciosa, los cuales se obtuvieron del banco de sangre del HIES, y fueron valorados por un médico antes de su inclusión y por último seis pacientes con artritis juvenil idiopática que asistían al servicio de medicina interna del HIES. Todos los sujetos o tutores de los sujetos firmaron el consentimiento informado por

escrito, y se les tomó una muestra de sangre por punción venosa, la cual fue recolectada en tubos con anticoagulante EDTA para su análisis posterior. Los datos clínicos de los pacientes con lupus se muestran en la tabla II.

Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica

Para cada muestra de sangre recolectada, se separó el paquete de células mononucleares para su estudio por citometría de flujo. Esto se realizó utilizando gradiente de densidad con ficol, el cual se vertió en un tubo falcón de 15 mL y se utilizó como cama, posteriormente se agregó cuidadosamente en una proporción 1:2 la muestra de sangre (3 mL de sangre total: 1.5 mL de ficol), ésta se centrifugó a 400 g por 30 min, a 25 °C, sin freno y con aceleración media. A continuación se procedió a separar el plasma y las células mononucleares utilizando una pipeta pasteur. El plasma se guardó en un tubo eppendorf y se congeló a -80°C. El paquete de células mononucleares se agregó a un tubo falcón estéril y se llevó a 10 mL con buffer de fosfatos salino (PBS), y se centrifugó a 250 g por 10 min. Esto se repitió dos veces más con 5 mL de PBS como lavado. Las células se resuspendieron en 2 mL de PBS y se contaron con azul de tripan utilizando cámara de Neubauer para medir la viabilidad. Las células se separaron en dos tubos FACS, uno para tinción de linfocitos B y el otro para tinción de células T.

Tinción para Subpoblaciones de Linfocitos B

El tubo para la tinción de linfocitos B, se centrifugó y se descartó el sobrenadante, con el fin de realizar una tinción con anticuerpos. Se le agregaron los siguientes anticuerpos marcados con fluorocromos: anti-CD20-APC/Cy7, anti- CD27-PE, anti-IgD-FITC, anti-IgM-APC, anti-CD10-PE/Cy7 y anti-CD38-PerCP/Cy5.5. Posteriormente se incubaron por 15min en la

Tabla II. Datos clínicos de los pacientes con LES pediátrico de este estudio.

	PLES*1	PLES*2	PLES*3	PLES*4	PLES*5	PLES*6
Edad (años)	17	13	14	13	14	14
Genero	Femenino	Masculino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino
ANA***	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Anti DNAdc****	Positivo	Positivo	N/D**	Positivo	Positivo	Negativo
Anti smith	Positivo	Negativo	N/D**	N/D**	N/D*	Positivo

*PLES: Paciente con lupus eritematoso sistémico

**N/D: No se determino

***ANA: anticuerpos anti-nucleares

****DNAdc: DNA de doble cadena

obscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugó a 250 g por 10min. Esto se repitió dos veces con 2 mL de PBS como lavado.

Al finalizar los lavados, las células se resuspendieron en 500 uL, se filtraron utilizando organza. Se adquirieron entre 250,000 y 500,000 eventos por cada muestra y se leyeron en un citometro de flujo FACS Canto II. El análisis se realizó utilizando el software FACS Diva v.6.0.1.

Tinción para Subpoblaciones de Células T

Para la tinción de células T se tomó la fracción de células mononucleares restante y se realizó el mismo procedimiento que para los linfocitos B pero utilizando los siguientes anticuerpos marcados con fluorocromo: anti-CD3-PE, anti-CD20-APC, anti-CD45RA-FITC y anti-CD8-PerCP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se cuantificaron las diferentes subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica en cuatro diferentes grupos de estudio con seis sujetos por grupo (pacientes con lupus pediátrico, sujetos pediátricos sanos, sujetos adultos sanos y pacientes con artritis juvenil idiopática). Las subpoblaciones se analizaron empleando diferentes marcadores y se dividieron en linfocitos B transicionales, linfocitos B vírgenes, linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (SCI) y linfocitos B de memoria con cambio de isotipo, además se incluyeron las subpoblaciones de linfocitos B vírgenes IgM negativas y linfocitos B de memoria CD27 negativas. Las diferentes subpoblaciones incluidas en este estudio se muestran en la figura 1. En los mismos sujetos de estudio, se realizó una tinción de células T como referencia. En este trabajo, al conjunto de células transicionales y vírgenes se les ha denominado pre-inmunes, por no haber sido expuestas a antígeno.

Caracterización de las Subpoblaciones de Linfocitos B

Para cada una de las muestras, la población total de células mononucleares se separó utilizando tamaño contra complejidad mediante dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) donde se localizó la población de linfocitos totales. De esta población se seleccionaron todas las células positivas a CD20, correspondientes a los linfocitos B totales, la cual corresponde a nuestra población de interés en este estudio.

La población de linfocitos B totales se graficó en función de IgD y CD27, de las cuales el total de linfocitos B que fueron IgD positivos y CD27 negativos, correspondieron al total de linfocitos B pre-inmunes, los que fueron CD27 positivos e IgD negativos correspondieron al total de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo y los que fueron IgD positivos y CD27 positivos (doble

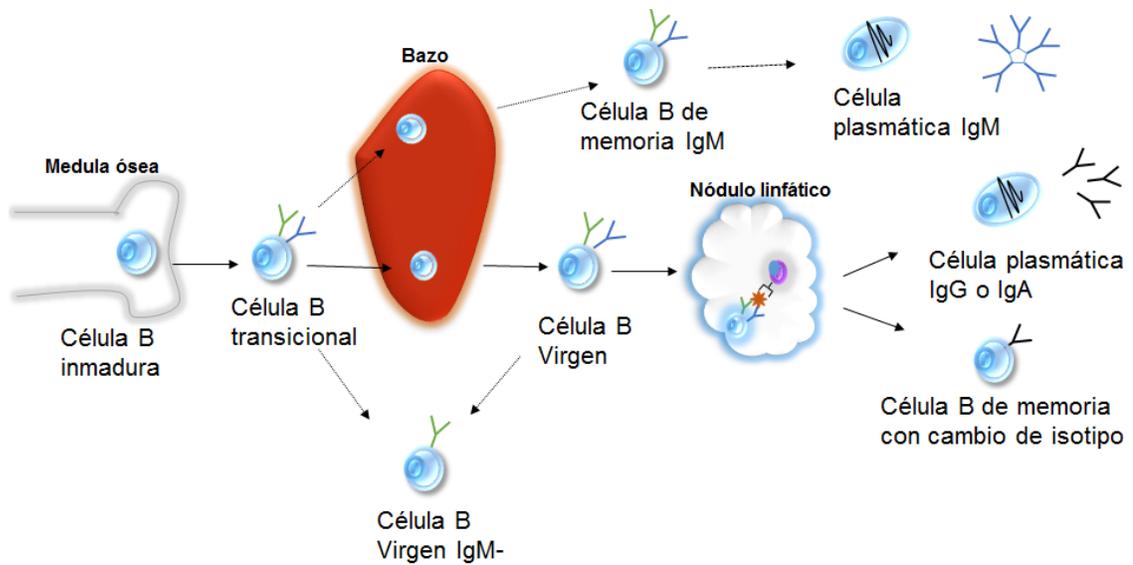


Figura 1. Subpoblaciones de linfocitos B descritas en humanos. En esta figura se puede observar los estadios de maduración de la célula B que encontramos en sangre periférica y los destinos que toma en diferentes tejidos linfáticos. Encontramos algunas de las subpoblaciones recientemente descritas como lo son los linfocitos B de memoria IgM, los linfocitos B de memoria CD27- y los linfocitos B vírgenes IgM negativas (Capolunghi y col., 2007; Quach y col., 2012; Wei y col., 2007).

positivos) correspondieron a los linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (*unswitched memory B cell*). Por último en el total de linfocitos B pre-inmunes se evaluó a los que expresaban altos niveles de CD10 y CD38 como linfocitos B transicionales. Este análisis se realizó en los cuatro diferentes grupos de sujetos de estudio (Fig. 2, Fig. 3 y Tabla III).

De los seis pacientes con lupus pediátrico analizados, uno de ellos fue eliminado debido a que había sido tratada con rituximab, un agente biológico que elimina las linfocitos B. Previamente, ha sido publicado que el tratamiento con agentes como el rituximab cambia la proporción de linfocitos B (Looney y col., 2004), por lo que se consideró que no representa una visión adecuada del proceso de maduración que sucede en los pacientes pediátricos con lupus.

Desafortunadamente, hay un gran vacío en la literatura respecto a la proporción de subpoblaciones de linfocitos B en pacientes pediátricos con lupus. Por lo tanto, más que comparar respecto a pacientes adultos, en este se comparó las subpoblaciones de linfocitos B respecto a otros sujetos en edad pediátrica.

Si bien no hay diferencias significativas entre los pacientes (tabla 3) pediátricos con lupus y sus respectivos controles pediátricos sanos, en cuatro de los cinco sujetos lúpicos se observa una clara disminución de la población de células de memoria con cambio de isotipo (Fig. 4). Este hallazgo, que debe ser confirmado con un incremento en el número de muestras, resulta inesperado ya que una de nuestras hipótesis era un aumento de la proporción de células de memoria en los pacientes con lupus, como consecuencia tanto de la inflamación crónica que padecen los pacientes, como de la estimulación antigénica constante, que lleva a la generación de autoanticuerpos. Para las edades analizadas, no hay una diferencia entre la proporción de células de memoria entre los sujetos control pediátrico y los controles adultos (Fig. 5).

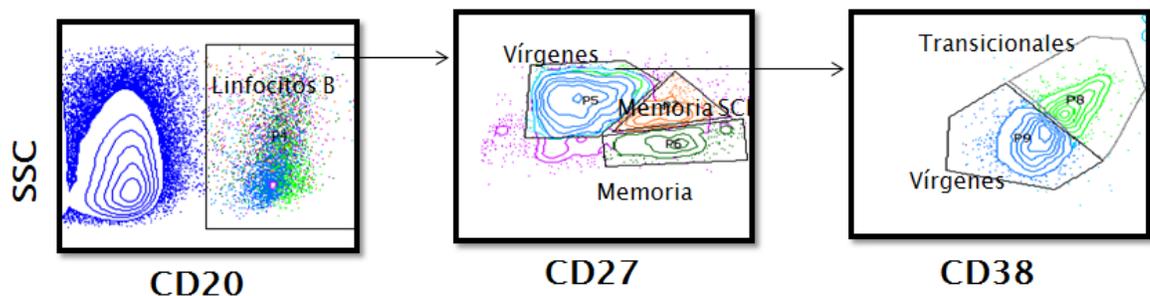


Figura 2. Selección de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B. La primera columna muestra la selección de linfocitos B (células CD20+). Estas células se analizaron respecto a IgD y CD27, en la cual se definieron tres subpoblaciones. El grupo de IgD+ y CD27- como linfocitos B vírgenes, el grupo de IgD- CD27+ como los linfocitos B de memoria, y el grupo de IgD+ y CD27+ como los linfocitos B de memoria que no presentan cambio de isotipo. Por último la subpoblación de linfocitos B vírgenes se refinó para separar los linfocitos B transicionales (CD10+, CD38+).

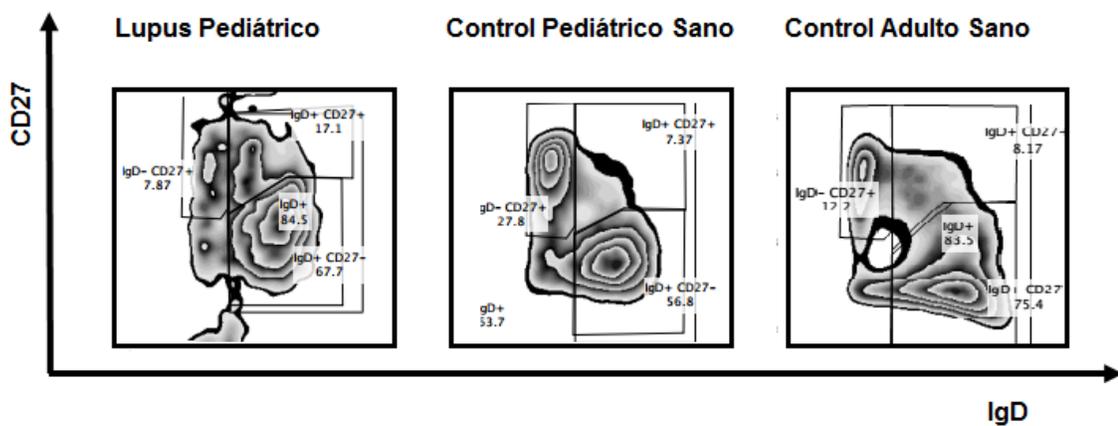


Figura 3. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en los diferentes grupos de estudio. En esta figura se observa la estrategia utilizada para seleccionar las diferentes subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica utilizando diferentes marcadores de superficie, donde se observan las subpoblaciones de linfocitos B vírgenes como IgD+ CD27-, linfocitos B de memoria como IgD-, CD27+ y células de memoria sin cambio de isotipo como IgD+, CD27+.

Tabla III. Frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con LES, pacientes con AJI, controles pediátricos sanos y controles adultos sanos.

	Control Adulto Sano n=6	Control Pediátrico Sano n=6	Lupus Pediátrico n=6	Artritis Juvenil Idiopática n=6
Células B Preinmunes	62.90%	55.20%	56.30%	45.90%
Células B Virgenes (CD20+IgD+CD27-)	57.6% ± 2.7	46% ± 4.3	44.7% ± 5.5	38.6% ± 2.2
Células B Transicionales (CD20+IgD+CD10+ CD38++)	5.3% ± 0.7	9.2% ± 1.5	11.6% ± 3.9	7.3% ± 2.0
Células B de Memoria (CD27)	29.70%	35.20%	28.20%	40.60%
Células B de Memoria IgM (CD20+IgD+IgM+CD27+)	8.6% ± 1.8	10.6% ± 1.4	9.2% ± 1.8	10.3% ± 1.8
Células B de Memoria con cambio de isotipo (CD20+IgD-CD27+)	21.1% ± 2.0	24.6% ± 3.1	19% ± 5.4	30.3% ± 3.5
Células B de Memoria CD27- (CD20+IgD-CD27-)	7.2% ± 1.3	9.3% ± 0.8	15.3% ± 5.2	12.3% ± 1.7

*Datos de promedio ± Desviación estandar

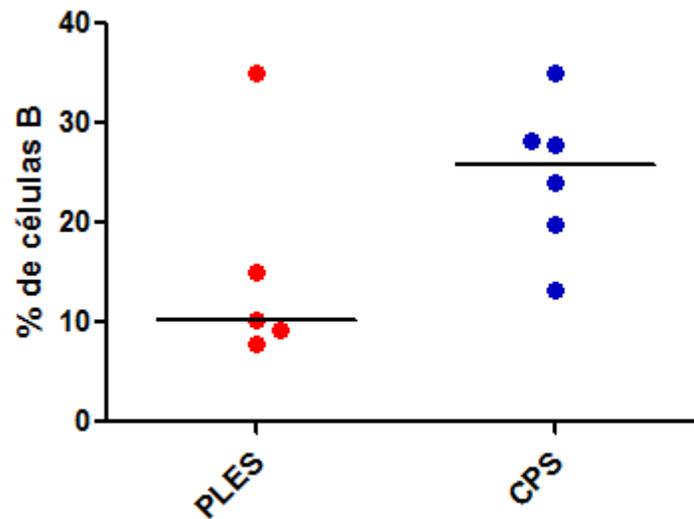


Figura 4. Gráfica de subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes con lupus pediátrico vs control pediátrico sano. En esta figura se comparan las subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo entre los pacientes con lupus pediátrico y sus controles pediátricos sanos, donde se puede observar una disminución en 4 de cinco pacientes con LES comparado contra los controles sanos.

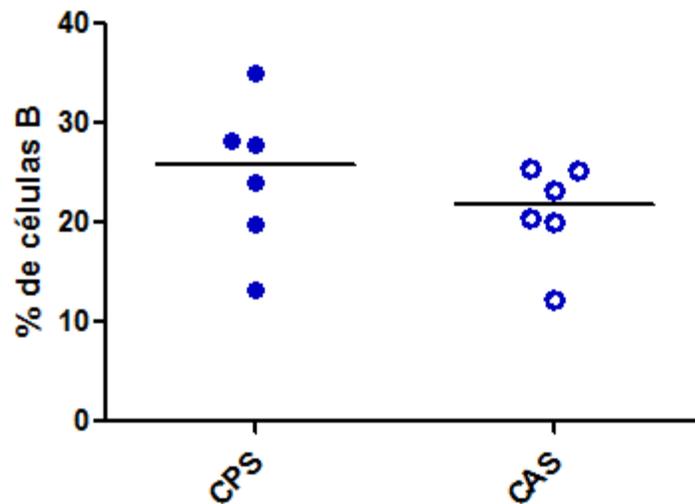


Figura 5. Gráfica de subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes controles pediátricos sanos vs control adulto sano. En esta grafica se comparan las subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo entre los grupos de controles pediátricos sanos y controles adultos sanos, sin observarse diferencias significativas.

Esto sugiere que a las edades analizadas en los controles pediátricos sanos, ya existe una cantidad de células de memoria semejante a la que se observa en los sujetos adultos sanos. Durante la infancia, la exposición antigénica lleva la aparición de células de memoria. La hipótesis de que este mismo proceso de exposición antigénica en pacientes con lupus pediátrico llevaría a un incremento en estas células, resultó desafiada por los resultados.

Existen dos posibles explicaciones para la disminución de los linfocitos B de memoria en pacientes pediátricos, por un lado, podría ser una consecuencia de la fisiopatología de la enfermedad, o podría ser un efecto del tratamiento inmunosupresor al que se encuentran sujetos estos pacientes. Para evaluar este punto, realizamos un análisis de la proporción de linfocitos B de memoria en pacientes con artritis idiopática juvenil, puesto que estos son pacientes pediátricos que reciben un tratamiento inmunosupresor similar al de los pacientes con LES. Los pacientes con artritis juvenil idiopática presentaron un incremento en esta subpoblación de memoria (Fig. 6), justificando el hecho del proceso inflamatorio crónico, y sugiriendo que esta reducción de memoria en los pacientes con lupus no es por el tratamiento.

Cuantificación de las Linfocitos B Vírgenes IgM Negativas

Para evaluar la subpoblación de Linfocitos B Vírgenes IgM negativas se utilizó el marcador anti-IgM. Esta subpoblación se tomó de las linfocitos B Vírgenes (CD20+, IgD+, CD27-), las cuales se dividieron como linfocitos B vírgenes IgM negativas o con baja expresión de IgM y linfocitos B vírgenes IgM positivas o con media o alta expresión de IgM (Fig. 7).

Los resultados obtenidos mostraron una diferencia claramente significativa ($p < 0.02$): un promedio de 21 % de linfocitos B IgM negativas en el grupo de pacientes con LES contrastando con más de 50 % en el grupo control pediátrico sano. (Fig. 8).

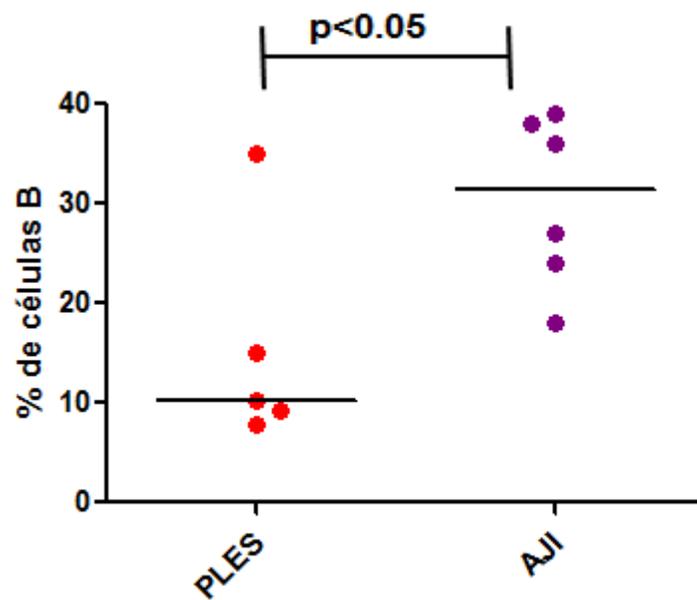


Figura 6. Gráfica de subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en pacientes con lupus pediátrico vs pacientes con artritis juvenil idiopática. En esta grafica se comparan las subpoblaciones de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo entre los grupos de pacientes con lupus pediátrico y pacientes con artritis juvenil idiopática ($p < 0.05$ con la prueba estadística U de Mann-Whitney).

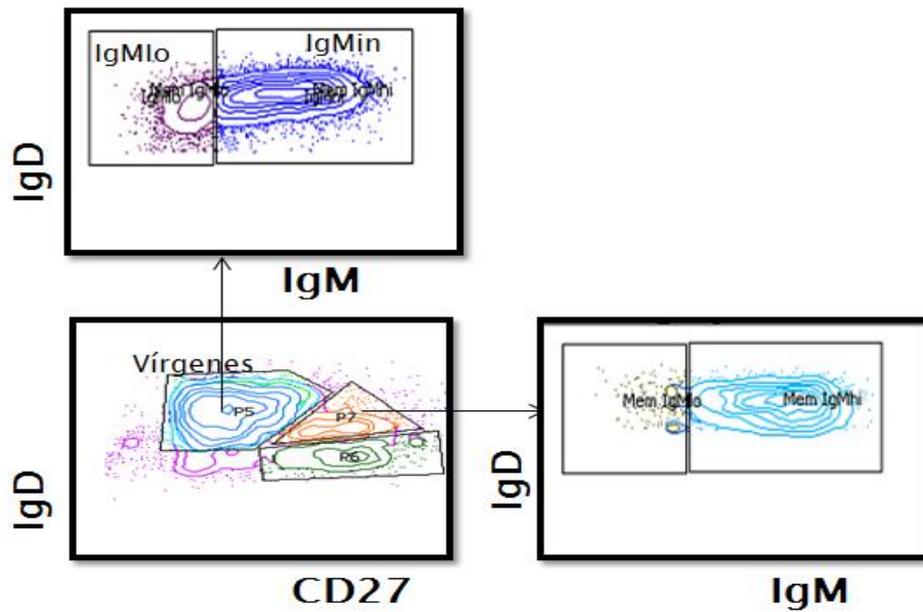


Figura 7. Selección de las subpoblaciones de linfocitos B vírgenes IgM negativas y células B de memoria IgM+ IgD+. En esta figura se observa la selección de las subpoblaciones de linfocitos B vírgenes IgM negativas (panel superior) a partir de la subpoblación de linfocitos B Vírgenes totales IgD positivas CD27 negativas. Además se muestra la selección de la subpoblación de linfocitos B de memoria IgM positivas, IgD positivas (panel inferior), a partir de la subpoblación de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo IgD positivas, CD27 positivas.

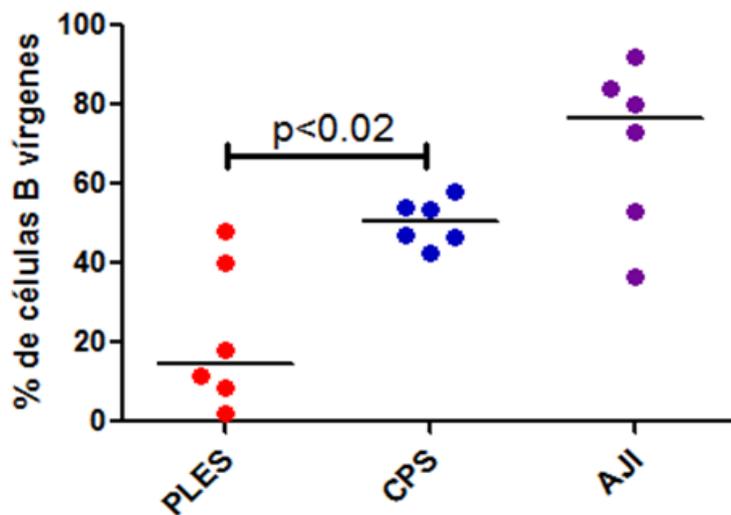


Figura 8. Proporción de linfocitos B vírgenes IgM negativas en diferentes grupos de estudio. En esta grafica se muestra la comparación de linfocitos B vírgenes IgM negativas en los diferentes grupos de estudio ($P < 0.02$ con la prueba estadística Kruskal-Wallis).

Esta subpoblación ha sido descrita como una población de linfocitos B en estado de anergia, con evidencia de presentar una pobre proliferación, bajo flujo de calcio y pobre producción de anticuerpos, además de poseer autorreactividad, y se han reportado incrementadas en LES adulto (Duty y col., 2008 y Quach y col., 2012). Sin embargo los resultados obtenidos muestran que en pacientes pediátricos con LES hay una cantidad muy pobre de linfocitos B IgM negativas o en estado de anergia.

Cuantificación de las Linfocitos B de Memoria IgM

Para evaluar la subpoblación de Linfocitos B de memoria IgM se utilizó el marcador anti-IgM en las linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (CD20+, CD27+, IgD+), las cuales se dividieron como linfocitos B de memoria IgM negativas y linfocitos B de memoria IgM positivas (Fig.7).

Los resultados obtenidos demostraron un comportamiento homogéneo en los cuatro grupos de estudio, obteniendo un aproximadamente un 80 % de Linfocitos B de memoria IgM en el grupo de pacientes con LES pediátrico, aproximadamente un 80 % en el grupo de controles pediátricos sanos, aproximadamente un 75 % en el grupo de control adulto sano y aproximadamente un 75 % en el grupo de pacientes con AR pediátricos (Fig. 9).

Esta población ha sido descrita como linfocitos B de memoria de primera defensa, las cuales son T-independientes e independientes de centro germinal, muy similares a las linfocitos B de zona marginal de ratón y a las linfocitos B-1a, y que protegen contra una primera respuesta principalmente ante antígenos encapsulados, estas células dan origen a células plasmáticas productoras de anticuerpos IgM.

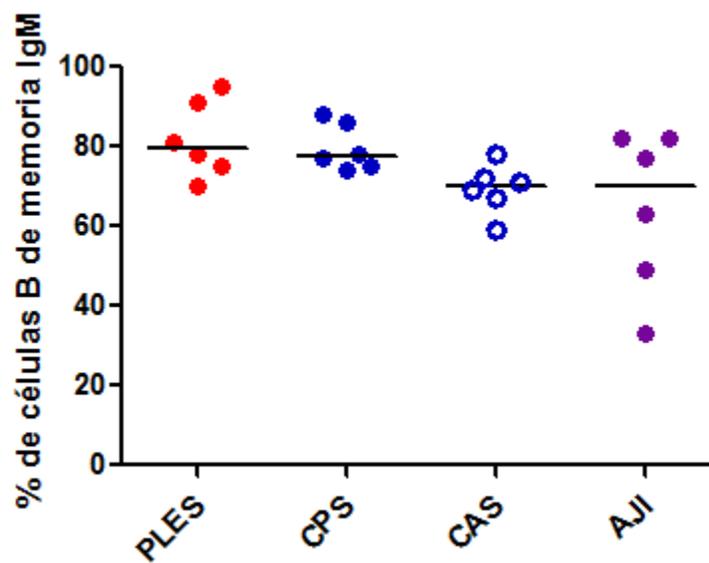


Figura 9. Proporción de linfocitos B de memoria IgM positivas IgD positivas en diferentes grupos de estudio. En esta grafica se muestra la comparación de la subpoblación de linfocitos B de memoria IgM positivas IgD positivas.

Caracterización de las subpoblaciones de Células T

La población total de células mononucleares de la tinción para células T se separó utilizando tamaño contra complejidad mediante dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) donde se localizó la población de linfocitos totales. De esta población se separaron todas las células positivas a CD3, la cual fue nuestra población de interés en este punto, correspondientes a los linfocitos T totales, y como exclusión a todas las células positivas a CD20, correspondientes a los linfocitos B totales. La población de linfocitos T totales se separó en los que expresaban CD8 y CD45RA, como los linfocitos T citotóxicos vírgenes, la población de linfocitos T que fueron positivos a CD8 pero negativos a CD45RA se tomaron como linfocitos T citotóxicos de memoria, la población de linfocitos T negativos a CD8 pero positivos a CD45RA, por exclusión de CD8, está constituida en su mayoría por linfocitos T cooperadores vírgenes, y los linfocitos T negativos a CD8 y negativos a CD45RA, contiene mayoritariamente T cooperadores de memoria (Fig. 10).

En esta población de células no se encontraron diferencias notorias, sin embargo se observa un incremento en las poblaciones de células de memoria tanto negativas a CD8 (bona fide cooperadoras) como CD8 positivas (citotóxicas) en el grupo de pacientes con lupus pediátrico y artritis idiopática pediátrica comparados con los controles pediátricos sanos. Esto se puede atribuir al proceso inflamatorio por el que cursan estos pacientes con autoinmunidad.

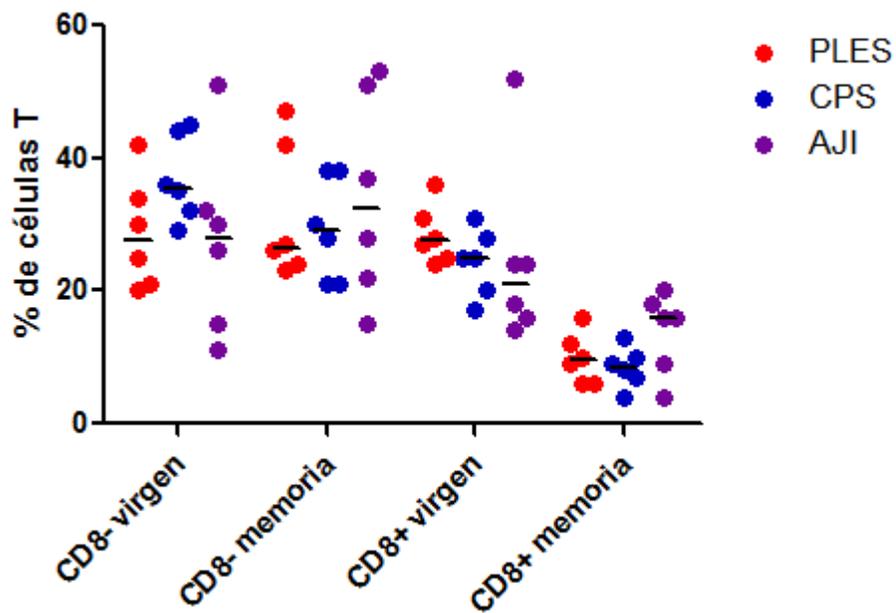


Figura 10. Proporción de diferentes subpoblaciones de células T en diferentes grupos de estudio. En esta grafica se muestra la comparación de las subpoblaciones de células T analizadas en los diferentes grupos de estudio, donde no se observan diferencias significativas entre ellos.

CONCLUSIONES

En este estudio se determinaron las diferentes subpoblaciones de linfocitos B (transicionales, vírgenes, memoria SCI y memoria) en sangre periférica de pacientes pediátricos diagnosticados con LES y se compararon contra un grupo control de sujetos pediátricos sanos, un grupo control de sujetos adultos sanos y un grupo de pacientes con otra enfermedad autoinmune de aparición pediátrica: artritis juvenil idiopática.

Se encontró que en cuatro de cinco pacientes hay una disminución en los linfocitos B de memoria con cambio de isotipo en el grupo de pacientes con LES pediátrico comparado contra los controles pediátricos sanos. Este hallazgo resultó sorprendente, dado que las células de memoria con cambio de isotipo se consideran fundamentales para originar a las células plasmáticas que producen los auto-anticuerpos que caracterizan la enfermedad. Consideramos dos factores que podrían explicar esta observación: (1) la exposición constante a los agentes inmunosupresores que se utilizan para el tratamiento del LES bloquea la generación de células de memoria; (2) el proceso patológico en pLES conduce a menor generación de células de memoria.

El primer punto, la contribución del tratamiento inmunosupresor a la generación de linfocitos B de memoria se evaluó al comparar los porcentajes en pLES contra los pacientes con artritis idiopática juvenil. El hecho de que en el grupo de artritis idiopática juvenil las células B de memoria con cambio de isotipo están incluso por encima de los controles sanos, sugiere que esta es una característica intrínseca del LES pediátrico, que merece ser estudiada con mayor detalle. Con el diseño experimental de este trabajo, resulta difícil evaluar si el proceso patológico en pLES reduce la generación de células B de memoria y en primer lugar estos resultados se deben confirmar en un segundo grupo de estudio. Recientemente se reportó que en sujetos adultos con LES, las células vírgenes pueden pasar directamente a células plasmáticas productoras de

anticuerpos (Tipton y col., 2015). Esto podría explicar la menor proporción de células B de memoria con cambio de isotipo en los pacientes con pLES.

El hallazgo más importante de este trabajo es la reducción en la población de linfocitos B vírgenes IgM negativas en el grupo de pacientes con lupus pediátrico comparado con todos los grupos de estudio. Los pacientes con artritis y los controles adultos mostraron un mayor porcentaje en esta subpoblación de linfocitos B que se consideran anérgicas. Aunque en este estudio no se llevaron a cabo ensayos funcionales, reportes en la literatura sugieren que estas células son hiporreactivas (Quach y col., 2011).

La disminución de las células vírgenes IgM negativas en pacientes con pLES podría representar una falla en los pacientes con lupus pediátrico para activar la inducción de anergia como un mecanismo de tolerancia y merece ser estudiada con mayor detalle.

En este trabajo no se encontraron diferencias en términos de subpoblaciones de células de memoria IgM en los pacientes pediátricos con LES. Es importante aclarar que el limitado número de muestras, debido principalmente al hecho de que el LES es una enfermedad que raramente se presenta durante la infancia, limita el análisis de varios de los parámetros estudiados en este proyecto. Por lo mismo, resulta de sumo interés, que se hayan encontrado diferencias en linfocitos B vírgenes negativas a IgM.

Estos hallazgos sugieren que la fisiopatología del lupus pediátrico es diferente al lupus en adultos. En un futuro, un mayor entendimiento del proceso fisiopatológico en el lupus pediátrico podrá permitir adaptar el tratamiento a estos pacientes, en la medida que nuevas alternativas terapéuticas, con mecanismos de acción claros, se encuentren disponibles.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashkenazi A., Dixit V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation, *Science*. 281(5381):1305–1308.
- Bachmann M.F., Odermatt B., Hengartner H., Zinkernagel R.M. 1996. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med*. 183(5): 2259–2269.
- Baechler E.C., Batliwalla F.M., Karypis G., Gaffney P.M., Ortmann W.A., Espe K.J., Shark K.B., Grande W.J., Hughes K.M., Kapur .V, Gregersen P.K., Behrens T.W. 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(5): 2610-5.
- Barbhaiya M., Costenbader K.H. 2014. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 23(6): 588-95.
- Benseler S., Silverman E. 2007. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am*. 33: 471-8.
- Berden J.H., Licht R., van Bruggen M.C., Tax W.J. 1999. Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 8(3):299-306.
- Bernasconi N.L., Traggiai E., Lanzavecchia A. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 298(5601): 2199–2202.
- Borba E.F., Bonfa E.2001. Long term beneficial effect of chloroquinediphosphate on lipoprotein profile in lupus patients with and without steroid therapy. *J Rheumatol*; 28:780-5.
- Buyon J.P., Petri M.A., Kim M.Y, Kalunian K.C., Grossman J., Hahn B.H., Merrill J.T., Sammaritano L., Lockshin M., Alarcón G.S., Manzi S., Belmont H.M., Askanase A.D., Sigler L., Dooley M.A., Feldt J.V., McCune W.J., Friedman A., Wachs J., Cronin M., Heath-Holmes M., Tan M., Licciardi F. 2005. The

- effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann intern Med.* 142:953-962.
- Caggiani M., Gazzara G. 2003. Lupus eritematoso sistémico en niños y adolescentes. Características clínicas, inmunológicas y evolutivas. Análisis. *Arch Pediatr Urug.* 74(4): 237-44.
- Capolunghi F., Rosado M.M., Sinibaldi M., Aranburu A., Carsetti R. 2013. Why do we need IgM memory B cells?. *Immunology Letters.* 152 114 – 120.
- Cassidy J.T., Petty R.E. 2005. editors. Juvenil dermatomyositis. In: *Textbook of Pediatric Rheumatology.* 5a ed. Philadelphia. WB Saunders: 407-41.
- Castillejo-López C., Delgado-Vega A.M., Wojcik J., Kozyrev S.V., Thavathiru E., Wu Y.Y. 2007. Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK. *Ann Rheum Dis.* 71: 136-42.
- Carsetti R., Kthler G., Lamers M.C. 1995. Transitional B Cells Are the Target of Negative Selection in the B Cell Compartment. *J. Exp. Med.*181: 2129-2140.
- Carsetti R., Rosado M.M., Wardemann H. 2004. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunological Reviews.* 197: 179–191.
- Carsetti R., Rosado M.M., Donnanno S., Guazzi V., Soresina A., Meini A., Plebani A., Aiuti F., Quinti I. 2005. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.*115: 412-7.
- Chang C. 2013. The pathogenesis of neonatal autoimmune and autoinflammatory diseases: a comprehensive review. *J immunol.* 41:100-110

- Clark G., Reichlin M., Tomasi T.B. 1969. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 102(1): 117-22.
- Danchenko N., Satia J.A., Anthony M.S. 2006. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 15(5): 308–18.
- Davis M.M. 2013. Stunting the Growth of Child Health Research A Need to Reframe «Children Are Not Small Adults». *JAMA Pediatrics.* 167(7): 598-9.
- Doreau A., Belot A., Bastid J., Riche B., Trescol-Biemont M.C, Ranchin B., Fabien N., Cochat P., Pouteil-Noble C., Trolliet P, Durieu I., Tebib J., Kassai B., Ansieau S., Puisieux A., Eliaou J.F., Bonnefoy-Bérard N. 2009. Interleukin 17 acts in synergy with B cell–activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology* 10, 778 – 785.
- Duró Pujol J.C. 2010. *Reumatología Clínica.* Elsevier. 1a ed. Travesera de García. Barcelona, España.
- Duty J.A., Szodoray P., Zheng N.Y, Koelsch K.A., Zhang Q., Swiatkowski M., Mathias M., Garman L., Helms C., Nakken B., Smith K., Farris A.D., Wilson P.C. 2009. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 206: 139–151.
- Enríquez-Mejía M.G. 2013. Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de Medicina e Investigación.* 1(1): 8-16.
- Fecteau, J.F., Cote´ G., Néron S. 2006. A New Memory CD27+ IgG+ B Cell Population in Peripheral Blood Expressing VH Genes with Low Frequency of Somatic Mutation. *J immunol,* 177: 3728 –3736.
- Garrone P., Neidhardt E.M., Garcia E., Galibert L., van Kooten C., Banchereau J. 1995. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes, *J Exp Med* 182(5):1265–1273.

- Goodnow C.C. 1992. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu Rev Immunol.* 10:489-518.
- Hahn B.H. 1998. Antibodies to DNA. *N Engl J Med.* 338(19): 1359-68.
- Hochberg M.C. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *ArthritisRheum.* 40: 1725.
- Huppa J.B., Davis M.M. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology.* 3: 973-983.
- Jain K.K. 1991. Systemic lupus erythematosus (SLE)-like síndromes associated with carbamazepine therapy. *Drug Saf.* 6:350-360.
- Kilmon M.A., Rutan J.A., Clarke S.H., Vilen B.J. 2005. Low-affinity, Smith antigen-specific B cells are tolerized by dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* 175: 37–41.
- Kilmon M.A., Wagner N.J., Garland A.L., Lin L., Aviszus K., Wysocki L.J., Vilen B.J. 2007. Macrophages prevent the differentiation of autoreactive B cells by secreting CD40 ligand and interleukin-6. *Blood.* 110(5):1595–1602.
- Koffler D., Schur P.H., Kunkel H.G. 1967. Immunologic studies concerning the nephritis of SLE. *J. exp. Med.* 126, 607.
- Kozyrev S.V, Abelson A.K., Wojcik J., Zaghlool A., Linga-Reddy M.V., Sanchez E., Gunnarsson I., Svenungsson E., Sturfelt G., Jönsen A., Truedsson L., Pons-Estel B.A., Witte T., D'Alfonso S., Barizzone N., Danieli M.G., Gutierrez C., Suarez A., Junker P., Lastrup H., González-Escribano M.F., Martin J., Abderrahim H., Alarcón-Riquelme M.E. 2008. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics* 40, 211 – 216.
- Kumar K.R., Li L., Yan M., Bhaskarabhatla M., Mobley A.B., Nguyen C., Mooney J.M, Schatzle J.D, Wakeland E.K., Mohan C. 2006. Regulation of B Cell Tolerance by the Lupus Susceptibility Gene Ly108. *Science.* 312(5780). 1665-1669.

- La Cava A. 2008. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 17(5):421-5.
- Loder F., Mutschler B., Ray R.J., Paige C.J., Sideras P., Torres R., Lamers M.C., Carsetti R. 1999. B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor-derived Signals. *J. Exp. Med.* 190(1): 75–89.
- Looney R.J., Anolik J.H., Campbell D., Felgar R.E., Young F., Arend L.J., Soland J.A., Rosenblatt J., Sanz I. 2004. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: A phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis & Rheumatis*. 50(8). 2580–2589.
- Malleson P., Tekano J. 2013. Diagnosis and management of systemic lupus erythematosus in children. *Pediatrics and Child Health*. 18(2): 61-9.
- Manjarrez-Orduño N., Marasco E., Chung S.A., Katz M.S., Kiridly J.F., Simpfendorfer K.R., Freudenberg J., Ballard D.H., Nashi E., Hopkins T.J., Cunninghame-Graham D.S., Lee A.T., Coenen M.J.H., Franke B., Swinkels D.W., Graham R.R, Kimberly R.P., Gaffney P.M., Vyse T.J., Behrens T.W., Criswell L.A., Diamond B., Gregersen P.K. 2012. CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nature Genetics*. 44, 1227–1230.
- Manjarrez-Orduño N., Tãm D Quách, Iñaki Sanz. 2009. B cells and immunological tolerance. *J inv dermatol*. 129(2), 278-288.
- Mason L.J., Isenberg D.A. 2005. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus, edn 3. In *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 809–824.
- Manson J.J., Isenberg D.A. 2003. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Neth J Med*. 61(11), 343-6.
- Maruyama M., Lam K.P., Rajewsky K. 2000. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. 407(6804):636–642.

- McCarty D.J., Manzi S., Medsger T.A., Ramsey-Goldman R., La Porte R.E., Kwok C.K. 1995. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 38(9): 1260–70.
- Meffre E. 2011. The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1246: 1–10.
- Morbach H., Eichhorn E.M., Liese J.G., Girschick H.J. 2010. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical and Experimental Immunology*, 162:271–279.
- Obermoser G., Pascual V. 2010. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 19(9): 1012-9.
- P Ng K., Cambridge G., Leandro M.J., Edwards J.C.W., Ehrenstein M., Isenberg D.A. 2007. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: long-term follow-up and predictors of response. *Ann Rheum Dis.* 66:1259-1262.
- Parijs L.V., Abbas A.K. 1998. Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off. *Science.* 280: 243-248.
- Paus D., Phan T.G., Chan T.D., Gardam S., Basten A., Brink R. 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med.* 203(4):1081–1091.
- Pérez J.V., García K.A., De la Cruz I.R. 2005. Manifestaciones clínicas de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. *Rev Med Dom.* 66(1): 80-3.
- Quách T.D. Manjarrez-Orduño N., Adlowitz D.G., Silver L., Yang H., Chungwen W., Milner E., Sanz I. 2011. Anergic Responses Characterize a Large Fraction of Human Autoreactive Naive B Cells Expressing Low Levels of Surface IgM. *J Immunol.* 186: 4640–4648.
- Ramírez J., Lukin K., Hagman J. 2010. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol.* 22(2): 177–184.

- Slifka M.K., Ahmed R. 1998. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol.* 10(3): 252–
- Sfikakis P.P., Boletis J.N., Tsokos G.C. 2005. Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Current Opinion in Rheumatology.* 17(5). 550-557.
- Sotelo N., Ibarra-Silva R., Monge L., Hurtado-Valenzuela J. 2006. Veintiocho años de experiencias en el manejo de niños con lupus eritematoso sistémico. Revisión de 26 casos. *Rev Mex Pediatr.* 73(2): 60-5.
- Stimpson W.H. 1988. Estrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T- suppressor/ cytotoxic subset. *Scand Immunol.* 28:345-350.
- Ramos P.S., Criswell L.A., Moser K.L., Comeau M.E., Williams A.H., Pajewski N.M., Chung S.A., Graham R.R., Zidovetzki R., Kelly J.A., Kaufman K.M., Jacob C.O., Vyse T.J., Tsao B.P., Kimberly R.P., Gaffney P.M, Alarcón-Riquelme M.E., Harley J.B., Langefeld C.D. 2011. A Comprehensive Analysis of Shared Loci between Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sixteen Autoimmune Diseases Reveals Limited Genetic Overlap. *Plos Genetics.* 7(12). 1-10.
- Tangye T.G., Good K.L. 2007. Human IgM+ CD27+ B Cells: Memory B Cells or “Memory” B Cells? *J immunol.* 179: 13–19.
- Tipton C.M., Fucile C.F., Darce J., Chida A., Ichikawa T., Gregoretti I., Schieferl S., Hom J., Jenks S., Feldman R.J., Mehr R., Wei C., Lee F.E., Cheung W.C., Rosenberg A.F., Sanz I. 2015. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 16(7):755-65
- Tobón G.J., Izquierdo J.H, Cañas C.A. 2013. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity—Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases.*

- Tsao B.P., Hui Wu. "The Genetics of Human Lupus." *Dubois' Lupus Erythematosus*. Ed. Daniel J. Wallace and Bevra Hannahs Hahn. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 54-81.
- Verthelyi D., Petri M., Yialamas M., Klinman D. 2001. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus*. 10:352-358.
- Wardemann H. , Yurasov S., Schaefer A., Young J.W., Meffre E., Nussenzweig M.C. 2003 . Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* .301: 1374–1377.
- Wei C., Anolik J., Cappione A., Zheng B., Pugh-Bernard A., Brooks J., Lee E.H., Milner E.C., Sanz I. 2007. 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*. 178: 6624 – 6633.
- Weller S., Braun M.C., Tan B.K., Rosenwald A., Cordier C., Conley M.E., Plebani A., Kumararatne D.S., Bonnet D., Tournilhac O., Tchernia G., Steiniger B., Staudt L.M., Casanova J.L., Reynaud C.A., Weill J.C. 2004. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 104(12): 3647–3654.
- Wirhth S., Lanzavecchia A. 2005. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*. 35(12): 3433–3441.
- Zonana-Nacach A., Rodríguez-Guzmán L.M., Jiménez,Balderas F.J., Camargo-Coronel A., Escobedo-de la Peña J., Fraga A. 2002. Factores de riesgo relacionados con lupus eritematoso sistémico en población mexicana. *Salud Pública Mex*. 44(3): 213-28.