

Tesis Doctoral

# Regulación de la linfopoyesis B por la cisteína proteasa catepsina-L

Badano, María Noel

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Badano, María Noel. (2012). Regulación de la linfopoyesis B por la cisteína proteasa catepsina-L. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Badano, María Noel. "Regulación de la linfopoyesis B por la cisteína proteasa catepsina-L". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

## **Regulación de la linfopoyesis B por la cisteín proteasa catepsina-L**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas.

**María Noel Badano**

Director de tesis: Dra. Irene Nepomnaschy

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET). División Inmunología Experimental,  
Academia Nacional de Medicina.

Buenos Aires, 2012

## RESUMEN

### Regulación de la linfopoyesis B por la cisteín proteasa catepsina-L

La catepsina-L (CTSL) es una proteasa lisosomal de expresión ubicua que presenta funciones diversas y específicas. Entre ellas, participa en la selección positiva de las células T CD4<sup>+</sup> y en la homeostasis de las células T. Utilizando como modelo experimental ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, portadores de una delección en el gen que codifica para la CTSL, estudiamos la influencia de la CTSL sobre la homeostasis de las células B. Observamos un incremento en el número de células B en los ganglios linfáticos (GL), el bazo y la sangre periférica (SP) de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. En el bazo, este incremento estuvo restringido a las células B transicionales T1 y T2 y a las células B de la zona marginal (ZM). No se detectaron alteraciones en los niveles de proliferación y apoptosis basales de las células B periféricas en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. La frecuencia y el número de células B en los distintos estadios de maduración de la médula ósea (MO) en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> resultó normal. Sin embargo, experimentos *in vitro* e *in vivo* demostraron que la linfopoyesis B se encuentra incrementada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Tanto los precursores de las células B como el microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> contribuyen a dicho incremento. Además la emigración de células B de la MO hacia el bazo se encuentra incrementada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. El conjunto de estos resultados indica que la CTSL regula negativamente la producción y exportación de los linfocitos B por la MO y el número de células B periféricas.

**Palabras clave:** catepsina L, linfocitos B, médula ósea, linfopoyesis B, células estromales, células B transicionales.

## ABSTRACT

### **B-lymphopoiesis regulation by the cysteine protease cathepsin-L**

Cathepsin-L (CTSL) is an ubiquitously expressed lysosomal cysteine protease with diverse and highly specific functions. The involvement of CTSL in thymic CD4<sup>+</sup> T-cell positive selection and T-cell homeostasis has been previously documented. Using CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mice that lack CTSL activity, we investigated the influence of CTSL activity on B-cell homeostasis. B-cell numbers were increased in lymph nodes (LN), spleen and blood from CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mice. Increases in splenic B-cell numbers were restricted to transitional T1 and T2 cells and to the marginal zone (MZ) cell subpopulations. No alterations in the proliferative or apoptosis levels were detected in peripheral B-cell populations from CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mice. In the bone marrow (BM), the percentage and the absolute number of B cells precursors and mature B cells were not altered. However, *in vitro* and *in vivo* experiments showed that BM B-lymphopoiesis was markedly increased in CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mice. Both BM microenvironment and B-cells progenitors would contribute to the increased B-lymphopoiesis in CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mice. Besides, BM B-cell emigration to the spleen was increased in CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mice. Overall, our data clearly demonstrate that CTSL negatively regulates BM B-cell production and output and the number of peripheral B cells.

**Key words:** cathepsin-L, B-lymphocytes, bone marrow, B-lymphopoiesis, stromal cells, transitional B cells.

## **Agradecimientos**

A mi mamá y a mi papá por permitirme realizar mis elecciones libremente y apoyarme en todas mis decisiones. A mi papá, le agradezco su enorme esfuerzo para que pueda estudiar tranquilamente, por creer siempre en mi y alentarme en todo momento. A mi mamá, por transmitirme sus valores, por los mejores consejos y por recordarme lo que verdaderamente es importante.

A mi hermana, por cuidarme y protegerme tanto. A mi hermano, por su complicidad.

A Sole, mi hermana del alma, por ser incondicional y nunca juzgarme.

A mis amigas de la vida, Morey, Yami, Andre, Peru y Uky, porque a pesar de que nos veamos poco, siempre estuvieron y estarán.

A Lore, Andy, Belu y Sofí, por ser únicas, y porque a pesar de que estén lejos las tengo presente siempre.

A Lu y Juli Etulain, por estar en uno de los momentos más difíciles y ayudarme a seguir adelante.

A Popi, por su amistad y por las mejores anécdotas.

A Lili, por abrirme libremente las puertas de la Academia y ayudarme en mis primeros pasos en la ciencia.

A Gaby Camicia, por todas sus enseñanzas y su enorme paciencia, a Juli M, Dani, Gabo, Bar, Juli G, Jose, Juan, Dami, Tito, Julián, Ceci y todos los que pasaron por el labo por su enorme ayuda y por tantos momentos compartidos. A Gaby Camerano y a Andita, gracias por estar siempre, por ayudarme en el día a día y saber que puedo contar con ustedes para todo.

A mi Directora Irene y a Isabel, por ofrecerme un lugar de trabajo y darme la posibilidad de realizar un Doctorado.

A las chicas “Palermo”: Vicky, Romi, Jime, Pili y Ana por su buena onda y ayuda.

A Patri, Ceci, Naty y Marie por su ayuda e interés.

A la Colo, Raúl y todos los investigadores de la Academia que me ayudaron.

A todas las personas que durante estos años estuvieron y permitieron que pueda realizar esta tesis.

## ÍNDICE

Resumen .....	2
Abstract .....	3
Agradecimientos .....	4
Abreviaturas .....	9
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>Generalidades del sistema inmune.....</b>	<b>12</b>
Linfocitos B .....	13
Ontogenia B .....	13
Rearreglos de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) .....	16
Estadios de diferenciación de los linfocitos B en la médula ósea (MO) .....	17
Isotipos y funciones de los anticuerpos .....	22
Subtipos de linfocitos B .....	23
A. Células B-2 o foliculares .....	23
B. Células B-1 .....	28
C. Células B de la zona marginal (ZM) del bazo .....	30
<b>La MO .....</b>	<b>34</b>
Células estromales (CE) de la MO .....	34
Fenotipo de las CE de la MO.....	35
A. Células endoteliales.....	35
B. Células reticulares .....	36
C. Adipocitos .....	36
D. Osteoblastos .....	37
E. Osteoclastos .....	38
F. Macrófagos .....	38
Factores reguladores de la linfopoyesis B .....	39
Nichos celulares para los linfocitos B .....	41

A. Osteoblastos -----	42
B. Osteoclastos-----	42
C. Células CAR-----	43
D. Células IL-7+ -----	44
E. Células GAL1+ -----	44
<b>Órganos linfoides secundarios</b> -----	47
Ganglios linfáticos (GL) -----	47
Bazo -----	50
<b>Catepsina L</b> -----	53
Funciones de la CTSL -----	55
Patologías asociadas a CTSL -----	56
Rol de la CTSL en el sistema inmune -----	57
A. Procesamiento y presentación antigénica en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II -----	57
B. Los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> : Influencia de la CTSL en la población de células T y en la composición de la ECM de los órganos linfoides -----	59
B.1. Origen de los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	59
B.2. Los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> : modelo experimental de la influencia de la CTSL sobre el sistema inmune -----	60
<b>OBJETIVOS</b> -----	62
<b>Objetivo general</b> -----	63
<b>Objetivos específicos</b> -----	63
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	65
Animales -----	66
Preparación de las suspensiones celulares -----	66

Citometría de flujo -----	67
Pulso de bromodeoxiuridina (BrdU) como ensayo de emigración de células de MO ----	68
Ensayos de apoptosis -----	68
Análisis del ciclo celular -----	69
Ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC) -----	69
Cultivos de CE de MO -----	70
Ensayos de UFC en presencia de CE -----	70
Ensayos de autorreconstitución de MO-----	70
Ensayos de trasplante de MO -----	71
Presentación de los resultados -----	71
Análisis estadístico -----	71
<b>RESULTADOS -----</b>	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 1. Análisis de las poblaciones de células B periféricas en los</b>	
<b>ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> -----</b>	<b>73</b>
1.1- Células B de los GL de los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	73
1.1.1- Mecanismos involucrados en el incremento de células B en los	
ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	75
1.2- Células B del bazo en los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	79
1.2.1- Mecanismos involucrados en el incremento de células B en el bazo de los	
ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	80
1.2.2- Caracterización de las subpoblaciones de células B del bazo -----	82
1.2.3- Mecanismos involucrados en el aumento de células B transicionales del	
bazo en los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	86
1.3- Células B en la sangre periférica (SP) de los ratones CTSL <sup>nkt/nkt</sup> -----	87
Capítulo 1-Conclusiones -----	90

<b>CAPÍTULO 2. Estudio de la maduración, producción y exportación de linfocitos B de la MO en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup></b>	91
2.1- Maduración de los linfocitos B	91
2.2- Producción de linfocitos B	93
2.2.1- Experimentos <i>in vitro</i> : ensayos de UFC	93
2.2.2- Experimentos <i>in vivo</i> : ensayos de autorreconstitución de MO	94
2.3- Exportación de linfocitos B	98
Capítulo 2-Conclusiones	102
<b>CAPÍTULO 3. Rol de los precursores hematopoyéticos y del microambiente de la MO en el incremento de la linfopoyesis B en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup></b>	103
3.1-Influencia de las CE de la MO en la sobrevivencia de las células B	103
3.2- Experimentos <i>in vitro</i> : ensayos de UFC sobre cultivos de CE	106
3.3- Experimentos <i>in vivo</i> : trasplantes de MO	109
3.3.1- Efecto de la ausencia de actividad de CTSL en el microambiente de la MO sobre la producción de los linfocitos B	110
3.3.2- Efecto de la mutación <i>nkt</i> en los progenitores de células hematopoyéticas de la MO sobre la linfopoyesis B	114
Capítulo 3-Conclusiones	118
<b>DISCUSIÓN</b>	119
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	132

## **ABREVIATURAS**

**7-AAD:** 7-Amino-Actinomicina D

**BrdU:** 5-bromo-2-deoxiuridina

**Cadenas H:** cadenas pesadas de las inmunoglobulinas

**Cadenas L:** cadenas livianas de las inmunoglobulinas

**CAR:** células reticulares caracterizadas por la expresión alta de CXCL12

**CDFs:** Células dendríticas foliculares

**CDs:** Células dendríticas

**CE:** Células estromales

**CG:** centros germinales

**CLPs:** progenitores linfoides comunes

**CPA:** célula presentadora de antígeno

**CRM:** células reticulares marginales

**CTSL:** catepsina L

**ECM:** Matriz extracelular

**FM:** foliculares maduras

**FRs:** fibroblastos reticulares

**GAL1:** galectina-1

**GL:** ganglios linfáticos

**HSCs:** células madre hematopoyéticas

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma

**Ig:** inmunoglobulina

**IL-:** interleuquina

**IL-7R:** receptor para la interleuquina 7

**IP:** yoduro de propidio

**KO:** Knock-out

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad

**MO:** Médula ósea

**MSCs:** células madre mesenquimales

**NK:** natural killer

**PBS:** tampón fosfato salino

**RE:** retículo endoplasmático

**SCF:** factor de células madre

**SFB:** suero fetal bovino

**SLC:** cadenas livianas sustitutas

**SP:** sangre periférica

**SPF:** libre de patógenos específicos

**Tc:** linfocitos T colaboradores

**TCR:** receptor de la célula T

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**VCAM-1:** molécula de adhesión celular vascular 1

**VEA:** vénulas del endotelio alto

**WT:** wild type

**ZM:** zona marginal

# **Introducción**

## Generalidades del sistema inmune

El medio ambiente contiene una gran variedad de microorganismos patógenos y diversas sustancias tóxicas o alérgicas que amenazan la salud. Sin embargo, gracias a un conjunto complejo de mecanismos de protección el sistema inmune generalmente logra controlar y eliminar a los patógenos y sustancias nocivas. Estos mecanismos se basan en la detección de ciertas características estructurales del patógeno o toxina que permiten su distinción de las células propias. La capacidad del sistema inmune de distinguir lo propio de lo no propio es esencial para evitar el daño hacia los propios tejidos.

Los mecanismos que permiten el reconocimiento y la respuesta frente a patógenos, toxinas o alérgenos pueden dividirse en dos categorías generales: a) aquellas respuestas codificadas por genes en la línea germinal del huésped y que se desencadenan ante el reconocimiento de patrones moleculares compartidos por muchos patógenos y toxinas, b) aquellas respuestas que son codificadas por genes que a través del desarrollo de rearrreglos somáticos producen moléculas que reconocen con alta especificidad estructuras extrañas únicas.

La primera serie de respuestas constituyen la respuesta inmune innata. Debido a que las moléculas de reconocimiento utilizadas por el sistema innato se expresan ampliamente en un gran número de células, este sistema está preparado para actuar rápidamente ante la exposición a un antígeno y por lo tanto constituye la respuesta inicial del huésped.

El segundo conjunto de respuestas constituyen la respuesta inmune adaptativa. En ausencia de antígenos extraños el sistema adaptativo consta de un pequeño número de células específicas para cada antígeno, por lo que luego de la exposición al mismo estas células proliferan y alcanzan un número suficiente capaz de montar una respuesta eficaz contra el antígeno. Por lo tanto, la respuesta adaptativa generalmente se expresa temporalmente después de la respuesta inmune innata<sup>1</sup>.

Entre los elementos celulares efectores que forman parte de las respuestas inmunes innatas se encuentran los neutrófilos, macrófagos y las células natural killer (NK), mientras que en las respuestas inmunes adaptativas participan los linfocitos T, encargados de la inmunidad celular, y los linfocitos B, que median la inmunidad humoral<sup>2-4</sup>.

## **Linfocitos B**

El hallazgo de los linfocitos B se produjo como consecuencia del descubrimiento de los anticuerpos. La historia del descubrimiento y la caracterización de los anticuerpos se remonta a 1890, cuando Behring y Kitasato demostraron que los sueros de animales inmunizados con la toxina diftérica eran capaces de neutralizar a la misma<sup>5</sup>. Obtuvieron los mismos resultados al utilizar la toxina tetánica y demostraron que los sueros obtenidos con las distintas toxinas presentaban especificidad para cada una de ellas<sup>5</sup>.

Luego en 1897, Ehrlich propuso que las toxinas eran capaces de generar antitoxinas séricas y que las células de la sangre a través de receptores podían interactuar con las toxinas de manera específica, lo que fue descrito como el reconocimiento del tipo de “una llave con su cerradura”<sup>6</sup>.

En los años posteriores y con el descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos ABO por Landsteiner, se sustituyó el nombre de antitoxina por el de anticuerpo y el de toxina por el de antígeno.

Posteriormente en 1948, Fagreaus sugirió que las células plasmáticas eran las responsables de generar los anticuerpos<sup>7</sup>.

En 1960 Cooper y Good demostraron que la población de linfocitos estaba compuesta por dos subtipos, a los que se denominó linfocitos T (por su dependencia del timo) y B (por su dependencia de la bolsa de Fabricio)<sup>8,9</sup>.

Posteriormente Coombs<sup>10</sup> y Froland<sup>11</sup> reportaron que la expresión superficial de las inmunoglobulinas (Ig) podría usarse como marcador de las células B, demostrando el nexo entre las células B y la producción de anticuerpos.

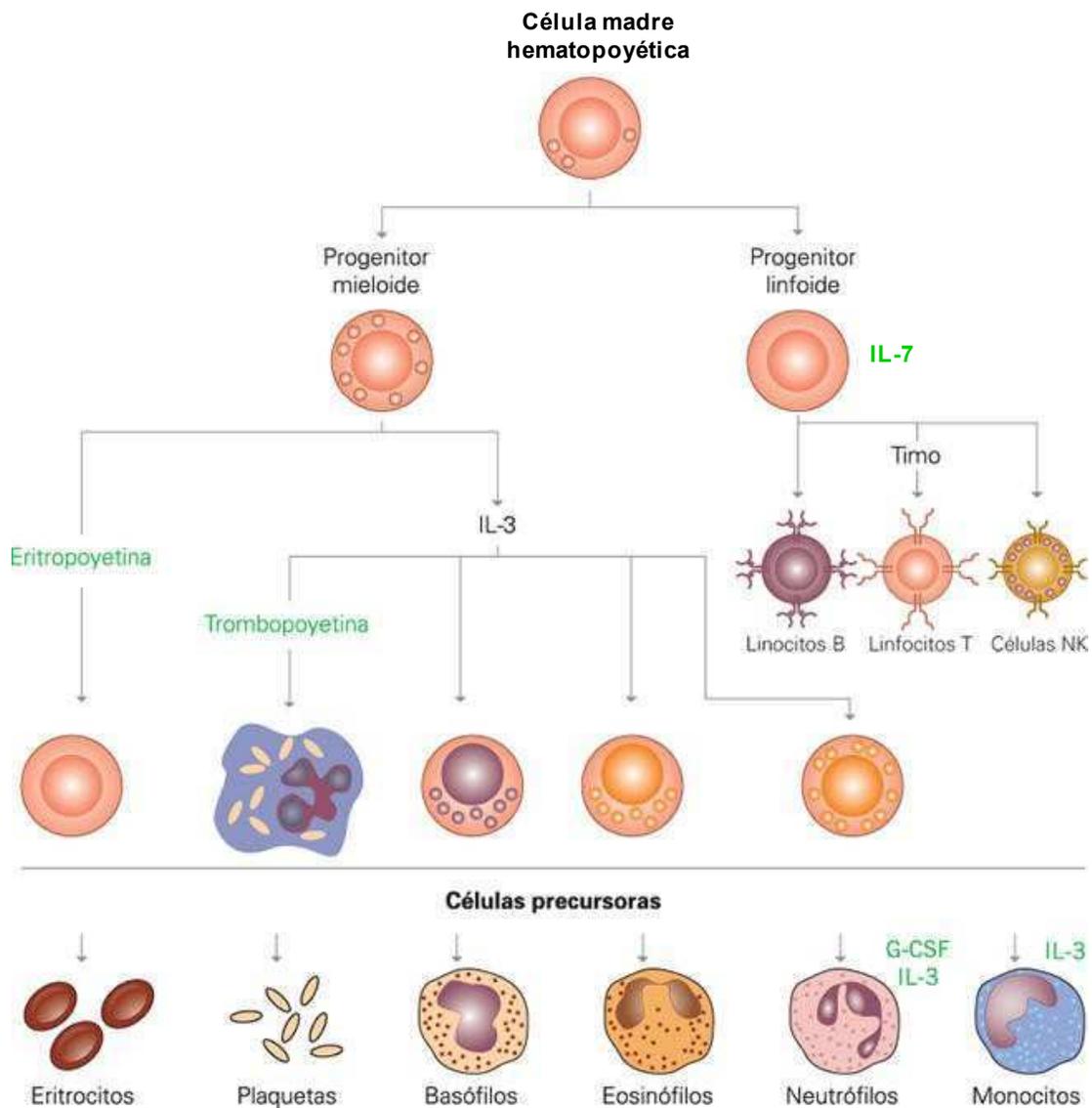
## **Ontogenia B**

En los mamíferos, el desarrollo de los linfocitos B se produce en el hígado fetal antes del nacimiento, mientras que luego del mismo, la hematopoyesis se llevará a cabo durante toda la vida en la médula ósea (MO)<sup>12</sup>.

Las células B se producen de manera continua a lo largo de la vida. Como el resto de las células hematopoyéticas, las células B derivan de células precursoras comunes denominadas células madre hematopoyéticas o *hematopoietic stem cells* (HSCs). Las HSCs se caracterizan por ser pluripotentes y tener capacidad de autorrenovación, lo que les permite sostener la homeostasis del sistema hematopoyético, ya que por un lado mantienen el tamaño del pool de HSCs y por el otro se diferencian asegurando la producción constante de las células sanguíneas<sup>13</sup>.

La diferenciación de las HSCs a células del linaje B se produce a través del pasaje por una serie de estadios intermedios durante los cuales las células van perdiendo su potencial de diferenciación<sup>14</sup>. Las HSCs son capaces de generar dos tipos de progenitores con potencial pluripotente más acotado: los progenitores mieloides comunes (CMPs), los cuales darán origen a células del linaje mieloides (eritrocitos, megacariocitos, monocitos y granulocitos neutrófilos, basófilos y eosinófilos)<sup>15</sup> y los progenitores linfoides comunes (CLPs), a partir de los cuales se generarán los linfocitos B, T y NK<sup>16</sup> (Figura A).

Por otro lado, aunque se han realizado numerosos estudios con el fin de encontrar al estadio intermedio entre los CLPs y el primer estadio de desarrollo de los linfocitos B, que adquiere el compromiso hacia el linaje B y pierde la capacidad de dar origen a otros linajes hematopoyéticos, todavía no se han obtenido resultados definitivos<sup>17,18</sup>.



**Figura A. Esquema representativo de la hematopoyesis.** Las distintas poblaciones de células sanguíneas se forman en la MO como consecuencia de la expansión y diferenciación progresiva e irreversible de células madre hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas dan origen a dos tipos de precursores: los precursores mieloides –que conducen a la formación de eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos– y los precursores linfoides, a partir de los cuales se originan los linfocitos B y T y las células NK.

## Rearreglos de los genes de las inmunoglobulinas

El receptor para el antígeno de los linfocitos B o BCR cumple dos roles distintos. Por un lado, transduce la señal al interior de la célula activando la transcripción de los genes involucrados en la proliferación y diferenciación de las células B a células plasmáticas<sup>19,20</sup>. Por el otro, media la internalización del antígeno, que conduce a su procesamiento proteolítico y posterior presentación como péptido asociado a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II<sup>21</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que entre los componentes del complejo BCR, la Ig es responsable del reconocimiento antigénico, mientras que el heterodímero CD79 $\alpha/\beta$  se encarga de la transducción de la señal al interior de la célula B<sup>22</sup>.

Las moléculas de Ig están constituidas por un par de cadenas pesadas (H) y livianas (L), cada una compuesta por una región variable y una constante, unidas entre sí por puentes disulfuro, de manera que forman un complejo de cuatro cadenas presentando dos sitios de unión al antígeno. La especificidad para los epítopes antigénicos está determinada por las secuencias hipervariables de las regiones aminoterminales de las cadenas H y L.

Inicialmente se sugirió que cada anticuerpo producido estaba codificado por un gen distinto<sup>23</sup>. Estas creencias se basaron en la observación de que la secuencia aminoacídica de la región variable era propia de cada anticuerpo. En 1965 Dreyer y Bennet hipotetizaron que la región constante de cada anticuerpo estaba codificada por un único gen y en cambio la región variable, por varios genes. Además propusieron, que durante el desarrollo de las células B se produciría una recombinación entre estos genes<sup>24</sup>.

Estudios posteriores demostraron que la región variable del locus de la cadena L está codificada por los segmentos génicos V y J, y que la región variable del locus de la cadena H por los segmentos V, D y J (VDJ). Además se ha demostrado que durante el desarrollo de las células B se produce un reordenamiento de los segmentos y que la unión azarosa de los mismos y la pérdida u adición de nucleótidos que se producen durante la recombinación, incrementa la diversidad de la región variable<sup>25</sup>. Por su parte, la región constante de ambas cadenas presenta una menor diversidad, ya que únicamente está codificada por los segmentos génicos C.

Por otro lado, en 1989 Baltimore descubrió a los genes activadores de la recombinación (RAG-1/2), identificando de esta manera a las enzimas encargadas de la recombinación de los segmentos VDJ<sup>26, 27</sup>.

Como resultado de la recombinación se genera un único gen VDJ que codifica para la región variable de la Ig. Por medio de splicing durante la transcripción, el segmento VDJ queda unido al segmento génico C de la región constante en el ARNm maduro<sup>23</sup>.

De esta manera se obtiene un repertorio diverso de rearrreglos VDJ que codifican para el BCR.

### **Estadios de diferenciación de los linfocitos B en la médula ósea**

Existen diferentes criterios que permiten clasificar a los precursores de los linfocitos B durante su desarrollo en la MO; uno de ellos está basado en la secuencia en la que se producen los rearrreglos de las cadenas H y L de las Ig<sup>28</sup>. De acuerdo a este criterio, el primer estadio de desarrollo de los linfocitos B identificado, denominado pre-pro-B, no presenta rearrreglos en los genes de las Ig<sup>29</sup>. Recién en el siguiente estadio de células pro-B comienzan los rearrreglos VDJ en las cadenas H<sup>30</sup>. Aquellas células pro-B con rearrreglos VDJ exitosos se diferencian a células pre-B, las cuales se caracterizan por la expresión citoplasmática de la cadena pesada  $\mu$ . La asociación de la cadena  $\mu$  con las cadenas livianas sustitutas (SLC), formadas por las proteínas  $\lambda 5$  y VpreB, conduce a la expresión superficial del receptor pre-B (pre-BCR)<sup>31,32</sup>, produciendo una disminución en la expresión de los genes RAG-1/2 de manera transitoria<sup>33</sup> y la proliferación de las células pre-B<sup>34</sup>. Posteriormente la célula pre-B disminuye la transcripción de los genes  $\lambda 5$  y VpreB<sup>35</sup>, dejando de sintetizar la SLC, y una vez que termina de proliferar comienza con los rearrreglos de la cadena L<sup>36,37</sup>. Aquellas células pre-B que rearrreglan de manera exitosa la cadena L, expresan en su membrana una molécula completa de IgM entrando de esta manera al pool de células B inmaduras. Es en este estadio donde se censa por primera vez la potencial autorreactividad del BCR, a través de los procesos de selección positiva y negativa<sup>38</sup>.

Las células B inmaduras seleccionadas pueden continuar su desarrollo en la MO, pero la mayoría emigra hacia el bazo donde se diferencian a células B maduras expresando en su membrana la molécula IgD<sup>39</sup>. Las células B que todavía no entraron en contacto con su antígeno específico (células B vírgenes) recirculan entre los órganos linfáticos secundarios y luego del contacto con el mismo se diferencian a células plasmáticas o B de memoria.

Las células B atraviesan distintos procesos de selección durante su desarrollo<sup>40</sup>. El ensamblado y expresión de un pre-BCR capaz de señalizar efectivamente es un importante punto de control en el desarrollo de las células B. Se requiere de un pre-BCR funcional para la selección positiva de las células pre-B y para la señalización que da como resultado una disminución de los rearrreglos VDJ<sup>33</sup> y la expansión proliferativa de las células pre-B<sup>38,40-42</sup>. Se ha propuesto que las cadenas H de los anticuerpos también son sujetas a procesos de selección<sup>43</sup>. Según este modelo, aquellas cadenas H que se asocian de manera adecuada con las SLC forman un pre-BCR efectivo y promueven la expansión clonal de las células pre-B<sup>43</sup>. En cambio aquellas cadenas H que se asocian pobremente con las SLC forman pre-BCR no efectivos<sup>44,45</sup>. Estas células pre-B entran en arresto y quedan sujetas a un segundo evento de recombinación de las cadenas H<sup>46,47</sup>. Si las nuevas cadenas H producidas se emparejan correctamente con las SLC serán seleccionadas positivamente<sup>48</sup>. Por lo tanto, la ausencia de la cadena H debido a un rearrreglo defectuoso impide el ensamblado del pre-BCR y resulta en un bloqueo en el estadio de células pro-B<sup>49-52</sup>. La ausencia de otros componentes del pre-BCR, como las SLC o CD79 $\beta$ , también bloquea el desarrollo de las células B en este estadio resultando en una menor generación de células B inmaduras y maduras<sup>53,54</sup>.

Recientemente se ha sugerido que el estadio de células pre-B sería además un punto de control de la tolerancia de las células B<sup>55</sup>. Ratones knock-out (KO) para las SLC presentan elevados niveles de anticuerpos anti-nucleares en suero, sugiriendo que células B autorreactivas podrían escapar de la selección negativa en ausencia de un control mediado por el pre-BCR.

En el ratón, la MO genera por día aproximadamente entre  $1-2 \times 10^7$  de células B inmaduras<sup>56,57</sup>, pero sólo entre un 10-20% de estas células abandona la MO y llega al bazo<sup>58</sup>. Esto se debe a que las células B inmaduras constituyen otro punto de control donde se censa la potencial autorreactividad de las células B. El encuentro de células B inmaduras con auto-antígenos capaces de entrecruzar el BCR puede conducir a: a) la eliminación de las células (delección clonal), b) la conversión a células no respondedoras de corta vida (anergia clonal) o c) a rearreglos en las cadenas L de las Ig para producir células B no autorreactivas (reedición del BCR)<sup>59</sup>.

En la MO pueden distinguirse tres tipos de células B inmaduras: las que expresan altos niveles de BCR no autorreactivos, las que expresan bajos niveles de BCR no autorreactivos y las que expresan BCR autorreactivos<sup>60</sup>. Varios estudios han indicado que es la intensidad de la señal del BCR lo que determina que las células B continúen en su desarrollo (selección positiva) o que reediten el BCR y escapen así de la apoptosis<sup>61-64</sup>. Las células B inmaduras que expresan altos niveles de BCR no autorreactivos reciben una intensidad de señal apropiada a través del BCR que les permite ser seleccionadas positivamente y proseguir en su desarrollo<sup>65</sup>. Estas células apagan la expresión de los genes RAG y pueden emigrar hacia el bazo<sup>66</sup>. Mientras que en las células B inmaduras que expresan BCR no autorreactivos pero en bajos niveles, la señalización a través del BCR está por debajo del umbral requerido para que sean seleccionadas positivamente, por lo que la expresión de los genes RAG no se apaga y se produce un segundo reordenamiento en las cadenas L de la Ig<sup>67</sup>. Si estos nuevos rearreglos generan BCR no autorreactivos que se expresan en altos niveles, las señales generadas a través del BCR serán de una intensidad adecuada permitiendo la selección de las células B inmaduras.

Por su parte, las células B inmaduras que expresan BCR autorreactivos, al encontrarse con el auto-antígeno generan una señal fuerte a través del BCR. Estas células no apagan la expresión de los genes RAG y reeditan el BCR permitiendo la generación de células B inmaduras no autorreactivas y su selección positiva<sup>67-69</sup>.

Por lo tanto el proceso de reedición del BCR permite rescatar de la apoptosis a las células B inmaduras con bajos niveles de BCR no autorreactivos o con BCR autorreactivos<sup>67</sup>.

A medida que las células maduran desde el estadio pre-pro-B hasta el de células B maduras, expresan otras proteínas de superficie además de las Ig que son características de cada estadio. Se han utilizado distintas estrategias basadas en la expresión diferencial de estos marcadores de superficie para identificar y aislar a las células de los distintos estadios de desarrollo de los linfocitos B y se han propuesto varias nomenclaturas para clasificar a los mismos<sup>28,59</sup>.

La proteína CD45R/B220, isoforma de la proteína CD45 (antígeno leucocitario común), es uno de los marcadores de superficie específicos de las células B, que se expresa durante todo el desarrollo de las células B, desde el estadio de células pre-pro-B hasta el de células plasmáticas. Inmediatamente después del estadio CLP, la restricción hacia el linaje de células B puede ser reconocido por la expresión de la molécula B220<sup>29</sup>.

Otra proteína que se expresa a partir del estadio de células pro-B y está presente en todos los estadios posteriores del linaje de células B es la molécula CD19<sup>70</sup>.

En 1991, Hardy R.R. y col. clasificaron a los estadios de células B de la MO en 7 fracciones (fracciones A-F) de acuerdo a la expresión diferencial de los marcadores de superficie B220, CD43, HSA (CD24), BP-1 e IgM<sup>71</sup>. Diferencias en la actividad funcional, en el estado de los rearrreglos de las cadenas de las Ig y en la expresión de marcadores de superficie indicaron que la maduración de las células B comienza en la fracción A y finaliza en la F. Así la fracción A corresponde al estadio de células pre-pro-B, las fracciones B-C al de células pro-B, la fracción D al de células pre-B, la E al de células B inmaduras y la F al de células B maduras (Figura B). Por lo tanto, mediante el uso de citometría de flujo Hardy R.R. y col. pudieron distinguir las fracciones A: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>-/lo</sup>, B-C: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hi</sup>, D: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>, E: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup> y F: B220<sup>hi</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>.

En 1994 Rolink y col. agregaron otros marcadores de superficie como c-kit, CD25, y las cadenas livianas sustitutas  $\lambda 5$  y VpreB para clasificar a los linfocitos B<sup>28,72</sup>.

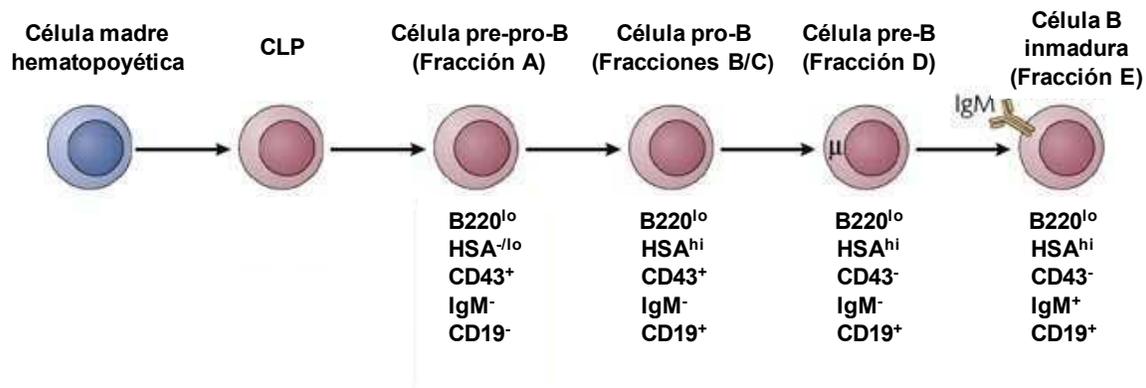
Posteriormente se observó que la fracción A de Hardy R.R. contenía además de progenitores de células B otras células no pertenecientes al linaje B, como las células NK y CD4<sup>+</sup>. El uso del marcador AA4.1 (CD93), el cual se expresa a partir de las HSCs y en todos los estadios inmaduros de células B, permitió identificar a los verdaderos precursores

de células B dentro de la fracción A (AA4.1+)<sup>73</sup>. Pero luego se observó que esta fracción AA4.1+ también contenía células con expresión para Ly-6C, que no correspondían al linaje de células B<sup>59,74</sup>.

Finalmente en el 2006, Hardy R.R. y col. realizan una citometría de flujo de 12 colores delimitando de forma más precisa a los precursores de células B contenidos en la fracción A<sup>75</sup>.

La lista de marcadores utilizados para identificar a los precursores de linfocitos B continúa creciendo hoy en día y paralelamente se pueden realizar citometrías de flujo de 17 colores<sup>76</sup>.

A pesar de esto, la nomenclatura acuñada por Hardy en 1991 resulta adecuada para poder identificar a los precursores de células B de la MO y actualmente es utilizada por la mayoría de los investigadores.



**Figura B. Clasificación de los estadios de desarrollo de los linfocitos B en la MO.** Los precursores de células B, caracterizados por la presencia de la molécula B220-marcador del linaje de células B- y la ausencia de IgM en su membrana celular, pueden ser divididos en 4 clases de acuerdo a la expresión diferencial de distintos marcadores de superficie celular. Estas 4 clases se denominan fracciones A (células pre-pro-B), B-C (células pro-B) y D (células pre-B). Las células B inmaduras (fracción E), generadas a partir de las células pre-B, expresan IgM en su superficie y emigran hacia el bazo para completar la maduración de las células B. Adaptado de Dorshkind y Montecino-Rodriguez. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 213–219.

## Isotipos y funciones de los anticuerpos

De acuerdo a la región constante de la cadena H ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ), las Ig se clasifican en 5 clases o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, que representan al 70%, 20%, 10% y 0.3 % respectivamente del pool de Ig plasmáticas, mientras que la IgD no se secreta<sup>23</sup>.

Durante la colaboración T-B en la respuesta inmune, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores (Tc) secretan diversas citoquinas que inducen el cambio de isotipo<sup>1</sup>. Este proceso involucra rearrreglos en el ADN en el cual intervienen varias enzimas como la desaminasa de citidina inducida por activación (AID), la uracil-ADN glicosilasa (UNG), la endonucleasa apurínica/apirimidínica (APE1) y la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK)<sup>77-79</sup>. El cambio de isotipo permite que un mismo rearrreglo VDJ pueda ser utilizado para generar anticuerpos de distinto isotipo pero con la misma especificidad antigénica<sup>80</sup>.

La secreción de interleuquina (IL) 10 por las células Tc induce el cambio de isotipo a IgG1 e IgG3, mientras que las IL-4 e IL-13 producen el cambio hacia IgE. Por otro lado, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y la IL-5 inducen el cambio a IgA y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) a IgG2.

La presencia de diferentes isotipos de anticuerpos aporta una gran plasticidad a la respuesta humoral, ya que permite generar anticuerpos contra una diversidad de agentes infecciosos. Estos isotipos realizan sus funciones efectoras a través de la unión de la región constante de la cadena H a receptores de distintas células como fagocitos, células NK y mastocitos, y a proteínas plasmáticas como las del sistema del complemento. Por ejemplo, la mejor respuesta contra bacterias encapsuladas ricas en polisacáridos consiste de anticuerpos IgM, que por un lado activan al sistema de complemento favoreciendo la lisis de los microorganismos<sup>81</sup> y por el otro inducen su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. Por otro lado, la respuesta a muchos virus y bacterias requiere de anticuerpos IgG<sup>82</sup>, que además de activar el complemento<sup>81</sup> y estimular su fagocitosis<sup>83</sup>, favorecen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mediante la cual las células NK son capaces de eliminar células infectadas recubiertas de anticuerpos<sup>84</sup>. Los virus y bacterias activan a los linfocitos Tc del subtipo TH1 a sintetizar IFN- $\gamma$  provocando de esta manera el cambio de isotipo hacia IgG.

A su vez, los helmintos activan a la subpoblación de linfocitos Tc TH2 a secretar IL-4 favoreciendo el cambio hacia IgE<sup>85</sup>, la cual participa de la erradicación de los helmintos mediada por eosinófilos<sup>86</sup>.

Por otro lado, diferentes localizaciones anatómicas tienden a presentar distintos isotipos. El principal isotipo presente en las mucosas es IgA, la cual protege de los microorganismos que penetran a través de los epitelios<sup>87</sup>.

## **Subtipos de linfocitos B**

De acuerdo a distintos criterios como la localización anatómica, capacidad migratoria y dependencia de las células Tc para la secreción de anticuerpos, las células B pueden dividirse en tres clases: B-1, B-2 o foliculares y las células B de la zona marginal (ZM) del bazo<sup>88</sup>.

### **A. Células B-2 o foliculares**

Los linfocitos B-2 o foliculares son los responsables de las respuestas inmunes humorales frente a antígenos proteicos, por lo que dependen de las células Tc para activarse y secretar anticuerpos. Reciben este nombre debido a que se localizan en los folículos de los órganos linfáticos secundarios, también conocidos como áreas B.

Las células B-2 o convencionales, se originan a partir de los precursores de células B que se desarrollan en la MO, por lo que su generación ocurre de manera continua. Luego de la expresión superficial del BCR, las células B inmaduras emigran desde la MO hacia el bazo para completar su maduración<sup>89</sup>. En el bazo, las células B inmaduras atraviesan una serie de estadios de desarrollo antes de entrar al pool de células B maduras, por lo que reciben el nombre de células B transicionales<sup>90</sup>. Se han descrito dos estadios de células B transicionales: T1 y T2. Las células B T1 dan origen a las células B T2, las cuales se diferencian a células B foliculares maduras (FM)<sup>91</sup> (Figura C).

Las células B-2 maduras presentan características fenotípicas y funcionales que permiten diferenciarlas de las células B transicionales<sup>92</sup>. Las células B-2 maduras se caracterizan por expresar altos niveles de B220, IgD y CD23, bajos niveles de HSA e IgM y la ausencia del marcador AA4.1, mientras que las células B transicionales se caracterizan por la baja expresión de B220, la alta expresión de HSA e IgM y por la expresión de AA4.1<sup>58,92-94</sup>. Además dentro de las células B transicionales, las células B T1 pueden diferenciarse de las células B T2 por sus bajos niveles de expresión de CD21 e IgD y por la ausencia de la molécula CD23<sup>88,91,94</sup>.

En cuanto a las diferencias funcionales, las células B transicionales responden de distinta manera que las células B maduras frente a distintos estímulos proliferativos *in vitro*. Las células B transicionales al igual que las células B maduras proliferan en presencia de LPS, pero a diferencia de ellas no proliferan en respuesta a la estimulación con anti-IgM y en su lugar mueren por apoptosis<sup>58,92,94</sup>.

Además, mientras que las células B maduras presentan una vida media de 2-4 meses, las células B transicionales tienen una vida media de entre 3-4 días<sup>58,93,94</sup>.

Se ha reportado que sólo entre el 10-30% de las células B transicionales pasa a formar parte del pool de células B maduras, lo que sugiere que las células B transicionales están sujetas a los procesos de selección positiva y negativa<sup>92,93</sup>. Como explicáramos estos procesos comenzarían en las células B inmaduras en la MO y continuarían durante el desarrollo de las células B transicionales en el bazo<sup>38, 95,96</sup>.

Durante la maduración de las células B transicionales a FM se puede observar la presencia de BCR autorreactivos que no fueron eliminados en la MO. Estos clones de células B deben ser silenciados o eliminados<sup>97</sup>. Por lo tanto, la selección negativa de las células B transicionales probablemente ocurra en el estadio T1 mediante múltiples mecanismos que pueden incluir delección clonal, anergia o reedición del BCR<sup>91,97,98</sup>. Se ha propuesto que, *in vivo*, este proceso estaría mediado por señales del BCR fuertes, mientras que la transición hacia células B T2 podría ocurrir a través de señales del BCR de intensidad apropiada<sup>97,99,100</sup>.

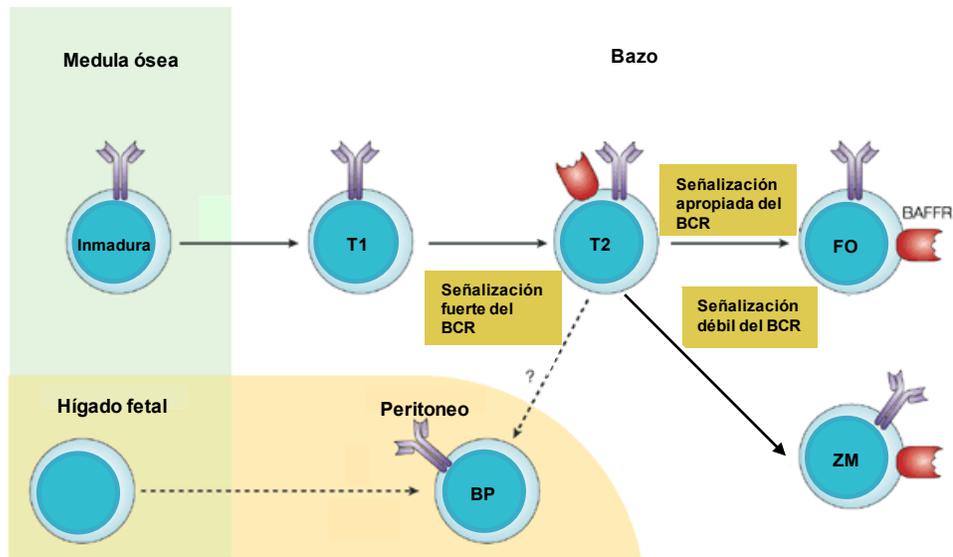
El análisis del repertorio de células B periféricas sugiere que la maduración de las células B también está regulada por eventos de selección positiva que probablemente ocurran en el

último estadio de células B transicionales<sup>97,99-102</sup>. Se ha reportado que diversas citoquinas específicas de linaje también pueden ser limitantes en la selección positiva y la supervivencia de las células B<sup>102,103</sup>. Una de ellas es el factor activador de células B (BAFF) la cual media la supervivencia de las células B transicionales principalmente a través del receptor BR3 o BAFFR<sup>104-107</sup>.

Es probable además que esta selección esté regulada por cambios en la calidad e intensidad de la señal del BCR que serían específicas de cada estadio<sup>97</sup>. Una hipótesis es que aquellos clones de células B T1 que no entran en apoptosis incrementan la señal del BCR, a través de un aumento gradual de la expresión de BR3, de correceptores del BCR y quizás también de proteínas de señalización intracelular. Por lo tanto, luego de la diferenciación las células B T2 presentan una mayor expresión de CD19, CD21 y BR3. Esto permite un incremento en la señalización del BCR y en la capacidad de supervivencia mediada por BAFF en las células B T2 con respecto a las células B T1<sup>107</sup>.

Mientras que la mayoría de las células B transicionales que sobreviven a los procesos de selección dan origen a las células B FM, un pequeño número se diferencia a células B de la ZM del bazo o a células B1<sup>90</sup>(Figura C). Es así, como el pool de células B periféricas está constituido principalmente por las células B FM.

Una vez completada la maduración, las células B-2 vírgenes recirculan a través de la sangre y la linfa entre los folículos de los órganos linfáticos secundarios.



**Figura C. Modelo esquemático de la maduración de las células B en la periferia.** Las células B inmaduras abandonan la MO y migran hacia el bazo donde atraviesan una serie de estadios de maduración antes de entrar al pool de células B maduras. Estos estadios de maduración comprenden a las células B transicionales T1 y T2. Las células B transicionales T1 se diferencian a T2, las cuales mayoritariamente darán origen a las células B foliculares (FO) y en una menor proporción a las células B de la zona marginal (ZM) y a las células B del peritoneo (BP). Adaptado de Hiroaki Niiro y Edward A. Clark. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 945-956.

Durante el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa se producen anticuerpos efectores de alta afinidad específicos para el patógeno o el inmunógeno, resultado de la interacción entre las células B y las células Tc. Esta respuesta precisa pero lenta, denominada Timo o T-dependiente, involucra generalmente a las células B-2. Estas respuestas se inician cuando las células B-2 que reconocen al antígeno en los folículos y las células Tc en las zonas T, migran hacia el límite entre los folículos y las zonas T para interactuar<sup>108</sup>. Estas interacciones involucran el reconocimiento de las células Tc del péptido presentado por las células B en el contexto de las moléculas del MHC de clase II, el contacto entre distintas moléculas presentes en los linfocitos B y T (CD40-CD40L y B7-CD28) y la secreción de diversas citoquinas<sup>109</sup>.

Las células B activadas pueden adoptar dos destinos: 1) dirigirse hacia las áreas extrafoliculares, proliferar y diferenciarse a células plasmáticas de vida corta que secretan anticuerpos de baja afinidad o 2) dirigirse hacia los folículos B y establecer centros germinales (CG)<sup>110-111</sup>.

Numerosos estudios han evidenciado que los CG son el sitio donde se producen la expansión clonal, el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad de los anticuerpos<sup>112-114</sup>. Además los CG son el sello distintivo de una respuesta T-dependiente y a partir de ellos se generan células plasmáticas de larga vida y células B de memoria<sup>112,113</sup>.

Estudios histológicos han identificado dos zonas en los CG: la zona oscura, que contiene células B grandes mitóticamente activas conocidas como centroblastos y la zona clara, que contiene células B pequeñas que no se dividen conocidas como centrocitos, células dendríticas foliculares (CDF) y linfocitos Tc<sup>114,115</sup>.

En los centroblastos tiene lugar la hipermutación somática, produciéndose mutaciones en las regiones variables de las Ig con el fin de aumentar la afinidad de los anticuerpos por el antígeno<sup>112,113</sup>. Los centroblastos luego se diferencian a centrocitos, los cuales migran hacia la zona clara del CG para iniciar los procesos de selección de la afinidad mediante los cuales compiten por antígenos depositados sobre la superficie de las CDF<sup>112,115</sup>. Aquellos centrocitos que hayan incrementado la afinidad de sus receptores, capturan e internalizan el antígeno para presentarlo a las células Tc. A través de la secreción de citoquinas y de la interacción entre distintas moléculas, las células Tc promueven la supervivencia de estos centrocitos y su diferenciación a células plasmáticas o células B de memoria<sup>112,115-117</sup>.

El movimiento de las células B entre la zona oscura y clara de los CG está controlado por la acción de distintas citoquinas y por la expresión diferencial de los receptores para las mismas. Las células estromales (CE) de la zona oscura producen mayores cantidades de la quemoquina CXCL12, atrayendo a los linfocitos B a esta zona a través de su receptor CXCR4<sup>118</sup>. Por otro lado, las CDF producen una mayor cantidad de CXCL13, que recluta a las células B por medio de su receptor CXCR5 a la zona clara<sup>118,119</sup>. Además la expresión de CXCR4 es mayor en las células B de la zona oscura, mientras que la expresión de CXCR5 se mantiene uniforme en todas las células B del CG<sup>115,118,120</sup>. Estos datos sugieren

que la expresión de CXCR4 está muy regulada en las células B de los CG y que es el principal factor que controla la localización de las células B en la zona oscura o clara.

Los centrocitos que sobreviven al proceso de selección de la afinidad experimentan además un cambio de isotipo<sup>121</sup>. Tanto la hipermutación somática como el cambio de isotipo están mediados por la enzima AID<sup>77</sup>, la cual se expresa en los centroblastos<sup>122</sup>.

En conclusión, la activación inicial de las células B-2 conduce al desarrollo de CG y a la generación de células plasmáticas extrafoliculares de vida corta que secretan anticuerpos de baja afinidad del tipo IgM, mientras que las células plasmáticas derivadas de los CG son de vida larga y secretan anticuerpos de alta afinidad con isotipos IgG, IgA e IgE<sup>115,123</sup>. Además las células B de memoria derivadas de los CG, se caracterizan por la expresión de un BCR mutado con una afinidad incrementada, por persistir luego de la exposición al antígeno, expandirse rápidamente durante las respuestas secundarias y por su capacidad para diferenciarse a células plasmáticas. Por lo tanto, las respuestas que involucran a las células B de memoria se caracterizan por la rápida producción de niveles incrementados de anticuerpos de alta afinidad pertenecientes a los isotipos IgG, IgA e IgE<sup>124-126</sup>.

## **B. Células B-1**

Las células B-1 se ubican predominantemente en la cavidad peritoneal y pleural, de manera que están prácticamente ausentes en los órganos linfáticos secundarios<sup>127,128</sup>.

Fenotípicamente los linfocitos B-1 pueden diferenciarse de las células B FM por los bajos niveles de expresión de CD23, IgD y B220 y por expresar CD43 y altos niveles de IgM<sup>129,130</sup>.

El linaje de células B-1 puede ser dividido en dos subpoblaciones que son fenotípicamente idénticas y que sólo se distinguen por la presencia (B-1a) o ausencia (B-1b) del marcador CD5<sup>127,131</sup>. Por el momento no se han encontrado diferencias funcionales entre ambas subpoblaciones<sup>131,132</sup>.

Una de las características particulares de los linfocitos B-1 es que, a diferencia de las células B-2, presentan capacidad de autorrenovación, ya que producen y secretan IL-10 que actúa como un factor autócrino que media su proliferación y supervivencia<sup>131,133,134</sup>.

Mientras que el desarrollo de los linfocitos B convencionales es conocido en detalle, se han propuesto diversas teorías acerca del origen y desarrollo de los linfocitos B-1<sup>129,130,135-137</sup>.

Una de las teorías propone que las células B-1 y B-2 derivan de precursores distintos y que por lo tanto representan productos finales de dos linajes diferentes. Las células B-1 serían generadas exclusivamente a partir de precursores fetales mientras que las células B-2 derivarían de precursores de la MO. De acuerdo a esta hipótesis, la presencia de las células B-1 estaría relacionada a su capacidad de autorrenovación y no a la generación permanente de células nuevas<sup>129,130,135,136</sup>. La teoría alternativa plantea un modelo de diferenciación inducida, mediante el cual cada célula B-2 tendría el potencial para diferenciarse a célula B-1. De acuerdo a este modelo, el reconocimiento de antígenos propios por el BCR transduciría una fuerte señal que dirigiría la diferenciación a células B-1<sup>127,129,130</sup>.

La combinación de ambas teorías sugiere que las células B-1 podrían originarse a partir de la expansión de unos pocos precursores y que la señalización a través del BCR sería necesaria tanto para la autorrenovación o el mantenimiento de las células B-1, como para iniciar la diferenciación a células B-1<sup>130,137,138</sup>.

Por otro lado se ha reportado también que las células B-1 peritoneales y las del bazo presentan diferencias fenotípicas, bioquímicas y funcionales lo que plantea la posibilidad de que presenten un origen distinto<sup>139</sup>.

Aunque el rol de los linfocitos B-1 en el sistema inmune no está claro, se le han atribuido distintas funciones basadas en la especificidad de los anticuerpos que producen. Por un lado, participan en la inmunidad bacteriana mediante la secreción espontánea de anticuerpos naturales que reconocen determinantes antigénicos comunes de la pared bacteriana como la fosforilcolina y el LPS<sup>130,140-145</sup>. Por el otro, los linfocitos B-1 producen un repertorio limitado de anticuerpos de baja afinidad que reconocen antígenos propios y participan en la remoción de restos celulares como los eritrocitos senescentes<sup>146</sup>. El reconocimiento de antígenos propios podría ser una consecuencia de la selección positiva mediada por los antígenos propios que conduce a la diferenciación de las células B-1<sup>127</sup>.

Además de ser la fuente principal de anticuerpos naturales del tipo IgM en sangre, se ha demostrado que los linfocitos B-1 forman parte de las células plasmáticas de las mucosas que secretan IgA<sup>147,148</sup>.

En correlación al rol de los antígenos propios en el desarrollo de los linfocitos B-1, los mismos tienden a ser autorreactivos y estar asociados a enfermedades autoinmunes<sup>146</sup>.

A pesar de que las células B-1 predominan en la vida fetal y luego su número disminuye, se ha demostrado que las células B CD5<sup>+</sup> incrementan nuevamente tanto en ratones como en humanos en edad avanzada<sup>149</sup>. Este hallazgo podría explicar la mayor incidencia de leucemia linfática crónica B y linfoma de manto, los cuales se cree que representan la transformación maligna de las células B CD5<sup>+</sup>, entre individuos de edad avanzada y media respectivamente<sup>150</sup>. Teniendo en cuenta la capacidad de autorrenovación de las células B-1 y los requerimientos mínimos para su progresión en el ciclo celular, no es sorprendente que puedan sufrir una desregulación del ciclo celular y dar origen a enfermedades neoplásicas.

### **C. Células B de la zona marginal del bazo**

Las células B de la ZM, junto con macrófagos especializados y células reticulares, se localizan en una zona del bazo que es externa a los folículos y que separa la pulpa blanca de la roja, conocida como la ZM<sup>151</sup>.

Las células B de la ZM se localizan próximas al seno marginal debido a los receptores del lisofosfolípido esfingosina-1-fosfato S1P1 y S1P3<sup>152</sup>. Los niveles de expresión de estos receptores son mayores en las células B de la ZM que en las foliculares. Se ha reportado que las células B de la ZM contrarrestan la atracción del gradiente de CXCL13 debido a señales mediadas por S1P1 y S1P3<sup>152</sup>. Cualquier disrupción de SP1 causa la relocalización de las células B de la ZM a los folículos<sup>153</sup>. Por lo tanto la señalización a través de S1P1 parecería contrarrestar el efecto mediado por CXCL13 de atraer a las células B de la ZM hacia los folículos<sup>152</sup>.

A diferencia de las células B foliculares, que expresan niveles altos de IgD y CD23, con niveles altos o bajos de IgM, las células B de la ZM expresan niveles altos de IgM y niveles

muy bajos de IgD y CD23. También expresan altos niveles de CD21 (receptor del componente C3d del sistema de complemento) y de CD1d. Además, las células B de la ZM expresan mayores niveles de moléculas coestimuladoras B7 comparadas con las células B foliculares<sup>154,155</sup>.

De la misma manera que ocurre con las células B-1, los antígenos propios jugarían un rol importante en la decisión del linaje de las células B en el bazo<sup>155</sup>. De acuerdo a este modelo aquellos BCR que reconocen antígenos propios con una afinidad apropiada, transducen señales de intensidad intermedia, que conducen a las células B a diferenciarse a foliculares. En cambio, aquellos BCR que reconocen a antígenos propios con una afinidad baja o no los reconocen, producen una señal débil que favorece el desarrollo de células B de la ZM<sup>155-158</sup>. Otro receptor clave para el desarrollo de las células B de la ZM es Notch2<sup>155</sup>. La presencia de células B de la ZM dependería de la vía de señalización mediada por Notch2, ya que ratones KO para Notch2<sup>159</sup> o su ligando DL-1<sup>160</sup> carecen de células B de la ZM.

Adyacente a la ZM se encuentra el seno marginal por el cual fluye la sangre que ingresa al bazo. Esto permite que las células de la ZM estén constantemente expuestas a grandes volúmenes de sangre y a cualquier antígeno que haya tenido acceso a la circulación sistémica. Por lo tanto debido a su localización especial, las células B de la ZM son capaces de responder rápidamente a los antígenos de la sangre y se considera que constituyen la primera y principal línea de defensa contra los patógenos de la sangre, especialmente contra las bacterias encapsuladas<sup>161,162</sup>.

Las células B de la ZM han sido relacionadas durante mucho tiempo con la respuesta frente a antígenos T-independientes, especialmente frente a los polisacáridos de las cápsulas bacterianas. Se ha reportado que los altos niveles de CD21 presentes en las células B de la ZM facilitarían la captura de complejos formados por antígenos polisacáridos y componentes del complemento<sup>161,163</sup>. La primera señal para la activación de las células B de la ZM proviene del reconocimiento del antígeno por el BCR y se ha propuesto que la segunda señal para la activación en forma T-independiente podría estar inducida por ligandos de los receptores tipo Toll. Sin embargo, la diferenciación de las células B de la ZM a células plasmáticas parecería depender de señales proporcionadas por CDs especializadas caracterizadas por una baja expresión de CD11c<sup>164</sup>.

Estas CDs son capaces de capturar patógenos de la sangre, activarse y migrar hacia la ZM del bazo para interactuar con las células B de la ZM y poseen además capacidades migratorias y fagocíticas mucho mayores comparadas a otras CDs activadas<sup>164</sup>. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas CDs presentan antígenos a las células B de la ZM no están claros.

En los últimos años se ha propuesto que las células B de la ZM además de participar en las respuestas T-independientes podrían participar en las respuestas T-dependientes<sup>155</sup>. Esta idea se basa en el hecho de que las células B de la ZM presentan muchas características que sugieren que son ideales para la presentación de antígenos proteicos y para la activación de las células Tc<sup>165</sup>. Por ejemplo, muestran mayores niveles de expresión de las moléculas del MHC de clase II y de las moléculas coestimuladoras B7 que las células B foliculares. Por lo tanto, se ha planteado que las células B de la ZM podrían estar involucradas en las respuestas B extrafoliculares frente a antígenos proteicos<sup>166</sup>. Estas respuestas tendrían lugar en la pulpa roja o en la interfase entre la zona T y la pulpa roja, no involucrarían la formación de CG, y podrían estar acompañadas por hipermutación somática y cambio de isotipo<sup>167</sup>.

Las células B de la ZM no suelen recircular, sin embargo su activación provoca la migración hacia los folículos<sup>168</sup>. De esta manera, pueden transportar antígenos a las células B foliculares<sup>152</sup>. Aunque las células B de la ZM podrían contribuir a las respuestas T-dependientes frente a antígenos proteicos transportando los mismos a las células B foliculares, también podrían activarse y recibir la ayuda de las células Tc para eliminar a los mismos. Esta migración probablemente se produzca debido a la capacidad de los antígenos de inducir una disminución en los niveles de expresión de S1P1, permitiendo que las células B de la ZM se muevan a favor del gradiente de CXCL13 hacia los folículos.

Además experimentos de transferencia de células han demostrado que las células B de la ZM son capaces de responder a antígenos T-dependientes artificiales<sup>169</sup>. En estos experimentos se ha observado que -de la misma manera que ocurre en las respuestas T-independientes- luego de la estimulación antigénica las células B de la ZM rápidamente se diferencian a células plasmáticas constituyendo la primera y principal fuente de anticuerpos IgM contra antígenos T-dependientes. Además estos estudios han reportado que las células

B de la ZM en respuesta a antígenos T-dependientes pueden formar CG, realizar hipermutación somática y generar células de memoria.

A pesar de estos resultados, todavía no hay evidencias directas de la participación de las células B de la ZM en las respuestas T-dependientes *in vivo*.

## **La MO**

La MO -lugar de origen de todas las células sanguíneas- es un tejido blando densamente celular, formado por los precursores de las células sanguíneas y su progenie, y por las células estromales (CE)<sup>170</sup>.

La MO presenta una densa red de senos vasculares medulares (sinusoides). La hematopoyesis ocurre en los espacios extravasculares entre los sinusoides, de manera que las células de la sangre y sus precursores se localizan entre los senos medulares<sup>171</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que la interacción de los precursores hematopoyéticos con una compleja estructura tridimensional formada por las CE y la matriz extracelular (ECM), es esencial para el desarrollo de una hematopoyesis normal<sup>170-172</sup>.

## **Células estromales de la MO**

El término “estroma” deriva del griego (cama) y del latín (colchón), ya que anteriormente se pensaba que las CE sólo proveían un soporte físico para las células hematopoyéticas<sup>173-174</sup>.

Posteriormente se observó que la interacción entre las CE y los precursores hematopoyéticos –entre ellos los de los linfocitos B- era crucial para su desarrollo, y que además de brindar el soporte mecánico, las CE producían factores necesarios para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B<sup>175,176</sup>. Entre los factores secretados por las CE se encuentran citoquinas, IL, quemoquinas y factores de crecimiento<sup>175,176</sup>.

Además se ha demostrado que las interacciones entre las CE y los precursores de células B a través de moléculas de adhesión, son esenciales no sólo para la retención de los precursores en la MO, sino también para la activación de diferentes vías de señalización involucradas en la supervivencia y proliferación de los mismos<sup>177-181</sup>.

Por otro lado, las CE son las encargadas de sintetizar la ECM y se ha reportado que las interacciones entre las integrinas de los precursores de células B y los componentes de la ECM resultan críticas para la maduración de los linfocitos B<sup>170,182,183</sup>.

La población de células que forman el estroma de la MO es heterogénea. Originalmente se creía que el estroma de la MO estaba formado básicamente por dos tipos celulares, las células epiteloides y los macrófagos<sup>184</sup>. Posteriormente se observó que el estroma de la MO estaba compuesto por una mayor diversidad de tipos celulares, tales como células endoteliales, reticulares, adipocitos, macrófagos, osteoclastos y osteoblastos<sup>172,174,185,186</sup>.

Las CE son heterogéneas además en su origen. Mientras que las células reticulares, adipocitos y osteoblastos derivan de células madre mesenquimales (MSCs), los macrófagos y osteoclastos tienen origen hematopoyético<sup>187,188</sup>.

## **Fenotipo de las CE de la MO**

### **A. Células endoteliales**

Las células endoteliales están presentes en todos los vasos sanguíneos del cuerpo. En la MO forman una barrera entre las células hematopoyéticas en desarrollo y la sangre. Constituyen el sitio de entrada a la MO de todas las células sanguíneas desde la circulación y también el lugar por el cual las células de la sangre abandonan la MO para entrar en el torrente sanguíneo<sup>189</sup>.

Las arterias entran a la MO a través del hueso cortical y continúan como capilares que confluyen en un sistema complejo de sinusoides de paredes delgadas y que se ramifican a lo largo de la cavidad de la médula<sup>190</sup>. Algunos de estos capilares tienen un lumen abierto, y permiten un flujo de sangre lento y la salida de las células de la sangre que son generadas en la médula.

Entre los marcadores que caracterizan a las células endoteliales se encuentran la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria-1 (PECAM-1) también conocida como CD31, el antígeno de células progenitoras hematopoyéticas CD34, el receptor de angiopoyetinas (Tie-2), el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) y la enzima óxido nítrico sintetasa III (eNOS)<sup>191,192</sup>.

## **B. Células reticulares**

Las células reticulares constituyen el tipo más abundante de CE de la MO<sup>193,194</sup>. Se las denomina también células reticulares adventicias o fibroblastos estromales<sup>174</sup>. Las células reticulares se caracterizan por poseer numerosas y largas ramificaciones y por la expresión de altos niveles de fosfatasa alcalina (ALP)<sup>174,193,194</sup>. Además, de sintetizar y mantener la red de fibras reticulares (colágenos tipo III) que proporcionan el apoyo físico para las células hematopoyéticas, las células reticulares sintetizan colágenos tipo I y osteonectina<sup>174,195</sup>.

Las células reticulares adventicias se localizan alrededor de los senos vasculares<sup>194</sup> y bajo ciertas circunstancias pueden diferenciarse a adipocitos y a osteoblastos<sup>174</sup>.

A pesar de que se tiene conocimiento de que las células reticulares expresan la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) también conocida como CD106, son células pobremente caracterizadas y todavía no se ha encontrado un marcador específico que permita identificarlas<sup>194</sup>.

## **C. Adipocitos**

Los adipocitos se caracterizan por ser células de gran tamaño (50-150  $\mu\text{m}$ ) con forma redondeada, especializadas en el almacenamiento de grasa. Contienen grandes depósitos de triglicéridos que forman una o más gotas lipídicas desplazando al núcleo y citoplasma hacia la periferia celular<sup>196</sup>.

A pesar de que se han identificado varios factores de transcripción involucrados en la diferenciación a adipocitos, como el receptor activado por factores de proliferación peroxisomal de tipo gamma (PPAR $\gamma$ )<sup>197</sup> y las proteínas de unión al enhancer CCAAT (C/EBP)<sup>198</sup>, en la actualidad no se ha logrado un marcador fenotípico para las células grasas. Sin embargo, pueden ser evidenciadas en cultivo mediante distintas técnicas de coloración que permiten observar las gotas lipídicas de los adipocitos, como por ejemplo la coloración con el colorante rojo oleoso<sup>172</sup>.

Se ha reportado que los adipocitos derivan de las células reticulares adventicias<sup>199</sup>. Las células reticulares adventicias pueden acumular lípidos y convertirse en adipocitos principalmente bajo dos circunstancias: a) durante el crecimiento del hueso, cuando la expansión de la cavidad medular genera espacio disponible que supera a lo requerido por las células hematopoyéticas, b) cuando hay una reducción en el número de células hematopoyéticas<sup>200</sup>.

Se ha reportado que los adipocitos se encuentran en áreas desprovistas de células hematopoyéticas y que las regiones de la MO que son hematopoyéticamente inactivas estén llenas de grasa<sup>172,200</sup>. Además se ha observado que la MO de pacientes con hipoplasia inducida por quimioterapia puede formar células grasas espontáneamente<sup>199</sup> y que bajo una mielosupresión las células reticulares adventicias pueden acumular grasa rápidamente y convertirse en adipocitos<sup>172</sup>. Por lo que se ha propuesto que la adipogénesis podría ser una respuesta fisiológica frente a un déficit hematológico.

Por otro lado se ha reportado que el número de adipocitos incrementa con la edad<sup>196</sup>.

Sin embargo, el rol de los adipocitos en la hematopoyésis no está muy claro. Se ha postulado que podrían actuar como inhibidores de la hematopoyesis o como reguladores del tamaño del nicho hematopoyético<sup>196,201</sup>.

#### **D. Osteoblastos**

El tejido óseo está sometido constantemente a un proceso de remodelación. Por un lado los osteoblastos promueven la formación del hueso, y por el otro los osteoclastos promueven la resorción ósea<sup>202</sup>.

Los osteoblastos se encuentran generalmente a lo largo del endostio, la capa interna del hueso. Entre las funciones de los osteoblastos se encuentran la síntesis, deposición y mineralización de la ECM del hueso, y la regulación de la diferenciación de los osteoclastos<sup>187,202</sup>.

## **E. Osteoclastos**

Los osteoclastos se originan a partir del mismo precursor hematopoyético que los macrófagos<sup>188,203</sup>. Se caracterizan por ser células multinucleadas de gran tamaño, producto de la fusión de precursores mononucleares osteoclásticos (preosteoclastos) y por poseer una porción de su membrana con numerosas microvellosidades (borde en cepillo), rodeada de un citoplasma libre de organelas llamada "zona clara"<sup>188,204,205</sup>.

Durante la resorción ósea, los osteoclastos secretan protones y enzimas (principalmente catepsina K) a través de las microvellosidades, que están en contacto con el hueso. Los protones son secretados a través de bombas de protones y favorecen la disolución de minerales, creando un microambiente ácido en el cual las enzimas pueden degradar al colágeno. Este microambiente está delimitado por la formación de un anillo de actina, entre el osteoclasto y la superficie ósea, que alberga a los protones y enzimas<sup>188,204,205</sup>.

Tanto el desarrollo de las microvellosidades como la formación del anillo de actina requieren de una activa reorganización del citoesqueleto de la célula<sup>204,205</sup>.

Además se ha reportado que por medio de la integrina  $\alpha v \beta 3$ , los osteoclastos se unirían firmemente a distintas proteínas del hueso (vitronectina, fibronectina, osteopontina)<sup>204,205</sup>.

Tanto el desarrollo como la activación del osteoclasto requieren de RANKL, el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK)<sup>203,205</sup>. Por otra parte la actividad de los osteoclastos es inhibida por la calcitonina<sup>188,204</sup>.

## **F. Macrófagos**

Los macrófagos son el segundo componente más abundante del estroma de la MO<sup>175,193</sup>. La MO contiene dos tipos de poblaciones de macrófagos: centrales y endosteales. Los macrófagos centrales se localizan a lo largo de la MO y están asociados a los precursores eritropoyéticos sosteniendo la eritropoyesis<sup>206</sup>. Los macrófagos endosteales u "osteomacs" promueven la función osteoblástica y la formación de huesos<sup>207</sup>. Los macrófagos se caracterizan por la expresión de las moléculas del MHC de clase II, CD14, CD11b, F4/80, CD80 y CD86<sup>191,192,207</sup>.

## Factores reguladores de la linfopoyesis B

La supervivencia, diferenciación, proliferación y desarrollo de las HSCs y de los progenitores hematopoyéticos (incluidos los progenitores de células B), así como la actividad funcional de las células maduras, está regulada por la acción de diversos factores de crecimiento producidos y secretados por las CE<sup>170,175,176,194</sup>.

Se han identificado diversos factores de crecimiento esenciales para el desarrollo de los linfocitos B como el factor de células madre (SCF), la IL-7, la quemoquina CXCL12 y el ligando de FLT3 (FLT3L)<sup>175,176,194,208</sup>. También se han identificado reguladores negativos de la linfopoyesis B como el TGF- $\beta$  y el IFN- $\gamma$ <sup>209</sup>.

La mayoría de los factores necesarios para el desarrollo de las células B actúan sobre determinados estadios de diferenciación de los mismos.

La quemoquina CXCL12, también conocida como factor 1 derivado de células estromales (SDF1) ó factor estimulante del crecimiento de las células pre-B (PBSF), tiene un rol crucial en el desarrollo de las células pre-pro-B<sup>210</sup>. El principal receptor fisiológico para la quemoquina CXCL12 es CXCR4, que es expresado por todos los estadios de células B a lo largo de su ontogenia<sup>211</sup>. Se ha reportado que ratones deficientes en CXCL12 o CXCR4 carecen de linfopoyesis B, demostrando la importancia del eje CXCL12-CXCR4 en dicho proceso<sup>212,213</sup>. Además, se ha demostrado que la presencia de CXCL12 incrementa la adhesión de las células pre-pro-B a las CE y que CXCR4 es esencial para la retención de los precursores de las células B en la MO, evitando su liberación a la sangre periférica (SP)<sup>214-216</sup>.

El eje CXCL12-CXCR4 también es fundamental en la regulación de la migración de las células plasmáticas hacia la MO, ya que en ratones deficientes para CXCR4 las células plasmáticas no migran hacia la MO<sup>214,217</sup>.

El FLT3 se expresa en la membrana de las CE y puede ser clivado proteolíticamente para generar una proteína soluble<sup>218</sup>. Tanto la forma de membrana como la secretada son biológicamente activas.

La interacción entre el FLT3L con su receptor FLT3 expresado por las células pre-pro-B es esencial para su desarrollo<sup>219</sup>. Además, ratones deficientes en FLT3L presentan una drástica reducción en el número de CLPs, con la consecuentemente disminución de los progenitores de células B y T<sup>220</sup>.

Recientemente se ha demostrado que la presencia de FLT3 activa la vía de señalización mediada por Ras induciendo la proliferación de los CLP y de las células pre-pro-B<sup>221</sup>.

Se ha reportado que la deficiencia conjunta de FLT3 y del receptor de la IL-7 (IL-7R) produce la ausencia total de células B-2 y células B-1, afectando también la linfopoyesis B fetal<sup>222</sup>.

Además se ha demostrado que el FLT3L junto a la IL-7 o al SCF potencia el crecimiento de las células pre-pro-B<sup>219</sup>.

En cuanto a la IL-7, fue identificada por su potencial para inducir la proliferación de células pro-B<sup>223</sup> y es la primer IL que ha demostrado ser esencial para el desarrollo linfoide<sup>224,225</sup>. Ratones deficientes en IL-7 o en IL-7R presentan defectos graves en el desarrollo de los linfocitos B y T<sup>224,225</sup>. Además se ha observado que la MO de ratones deficientes en IL-7 o IL-7R presenta números normales de células pre-pro-B, mientras que el número de células pro-B, pre-B y de estadios de células B más maduros se encuentra severamente disminuido<sup>224,225</sup>.

Se ha reportado que la proliferación de las células pro-B requiere de la activación de la vía de señalización IL-7R/STAT5. A su vez se ha demostrado que Ras promueve la proliferación de células pro-B aumentando los niveles de IL-7R y suprimiendo la expresión de *socs2* y *socs3*, que actúan como reguladores negativos de STAT5<sup>221</sup>.

Además la IL-7 promueve la expresión de distintos factores de transcripción como E2A, EBF y Pax-5 los cuales son esenciales para inducir el compromiso hacia el linaje B y para iniciar los rearrreglos VDJ de las Ig<sup>226,227</sup>.

Por otro lado la IL-7 también es capaz de mediar la supervivencia de los precursores de células B y se cree que lo hace a través de la inducción de la proteína antiapoptótica MCL1<sup>228</sup>.

Por su parte el SCF, citoquina unida a la membrana de las CE, interactúa con el receptor c-kit presente en las células pro-B estimulando su desarrollo<sup>229,230</sup>. Los ratones deficientes en SCF o c-kit presentan fenotipos similares, con bloqueos en el desarrollo de muchos tipos celulares, incluyendo a células primordiales germinales, melanoblastos y células hematopoyéticas. Por lo tanto, la reducción en el número de precursores de células B en los ratones deficientes en c-kit probablemente se deba a alteraciones producidas a nivel de los CLPs<sup>231</sup>.

Entre los factores que tienen un efecto negativo sobre el desarrollo de las células B se encuentra el TGF- $\beta$ . Como regulador negativo de la linfopoyesis B, inhibe la proliferación y estimula la apoptosis de las células pro-B y pre-B<sup>232</sup>. Este efecto estaría mediado por la inhibición de la actividad de IL-7<sup>233</sup>.

Otro regulador negativo del desarrollo de las células B es el IFN- $\gamma$ . Se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  produce un arresto en la proliferación de las células pre-B lo que conduce a su muerte por apoptosis<sup>234</sup>. Además se ha reportado que la estimulación de líneas de células pre-B con IFN- $\gamma$  conduce a una menor capacidad de respuesta a IL-7<sup>235</sup>. También se ha demostrado que niveles incrementados de IFN- $\gamma$  producirían una disminución en el número de células pre-B<sup>236</sup>.

## **Nichos celulares para los linfocitos B**

Se ha propuesto que las CE de la MO crean microambientes específicos, conocidos como nichos, que proporcionan el soporte y factores esenciales para el desarrollo y mantenimiento de las distintas células hematopoyéticas, entre ellas, el de las células B<sup>170,194,214,237,238</sup>.

En los últimos años se han identificado distintos tipos de CE implicados en la formación de nichos celulares específicos para el desarrollo de las células B<sup>194,214,237,238</sup>. Entre ellos se encuentran los osteoblastos, los osteoclastos y distintas poblaciones de células reticulares

entre las cuales se encuentran las células CAR, caracterizadas por la alta expresión de CXCL12, los fibroblastos caracterizados por la expresión de IL-7 (IL-7+) y las células positivas para galectina-1 (GAL1+)<sup>170,194,214,237-239</sup>.

## A. Osteoblastos

Tanto estudios *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que los osteoblastos son reguladores esenciales del desarrollo de todas las células sanguíneas, incluyendo el de las células B<sup>240-241</sup>. Se ha observado que la depleción de células del linaje osteoblástico induce una marcada reducción de células B totales así como de progenitores eritroides<sup>242</sup>. Un estudio reciente muestra además que cultivos primarios de osteoblastos murinos son capaces de sostener el desarrollo de las células B *in vitro* y que la depleción de osteoblastos *in vivo* reduce severamente los niveles de células pre-pro-B y pro-B de la MO<sup>243</sup>. El hecho de que los osteoblastos producen CXCL12, IL-7 y SCF podría asociarse a su rol en la regulación de la diferenciación de los linfocitos B<sup>240,243,244</sup>.

## B. Osteoclastos

Varios estudios han demostrado que la actividad de los osteoclastos puede modular el desarrollo de las células B. Por ejemplo en ratones con mutaciones que conducen a osteopetrosis (enfermedad caracterizada por la ausencia o menor actividad de los osteoclastos) se ha observado un defecto en el desarrollo de las células B<sup>245-248</sup>.

Entre los modelos de osteopetrosis se encuentran los ratones *oc/oc*, portadores de una mutación en el gen *Tcirg1*. En estos ratones los osteoclastos son inactivos y la transición de las células pro-B a pre-B está bloqueada como consecuencia de los menores niveles de IL-7 en la MO, lo que conduce a un mayor porcentaje y número de células pro-B<sup>249-251</sup>.

Estudios posteriores demostraron que por medio de la transferencia de células dendríticas (CDs) de ratones normales a ratones *oc/oc*, es posible reestablecer la actividad de los osteoclastos e incrementar la linfopoyesis B, indicando la importancia de la actividad de los

osteoclastos en el establecimiento de un microambiente adecuado para el desarrollo de las células B en la MO<sup>252,253</sup>.

Además estudios en los que se indujo una osteopetrosis leve por medio de la inyección de ácido zoledrónico en ratones normales, demostraron que la actividad de los osteoclastos juega un rol en el control del desarrollo de las células B en la MO a través de la regulación de las células mesenquimales que forman los nichos de células B, como los osteoblastos<sup>253</sup>.

### **C. Células CAR**

Estudios enfocados en la quemoquina CXCL12 revelaron que células reticulares especiales de la MO, denominadas células CAR, funcionarían como nichos para las HSCs y para los precursores más tempranos de células B<sup>194,214,237,254</sup>.

Las células CAR se caracterizan por expresar altos niveles de CXCL12 y SCF, por su distribución uniforme en la MO rodeando los senos vasculares, y por sus ramificaciones largas a través de las cuales generan las redes reticulares<sup>194,214,237,254</sup>. Las células CAR carecen de la expresión de marcadores endoteliales (CD31), osteoblásticos (osteopontina y osteocalcina), hematopoyéticos (CD45) o de células musculares lisas ( $\alpha$ -SMA), mientras que son positivas para VCAM-1, CD44, PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ <sup>214,237,255</sup>. Además, las células CAR tienen potencial para diferenciarse a adipocitos y osteoblastos<sup>255</sup>. Todos estos datos indican que las células CAR son una subpoblación de las células reticulares de la MO<sup>194,214</sup>. Numerosas evidencias sugieren las células CAR funcionarían como nicho para las células B. Por ejemplo, se ha observado que la mayoría de las células pre-pro-B y de células plasmáticas están en contacto con las prolongaciones de las células CAR<sup>194,214</sup>. Además, se ha reportado que una disminución en el número de células CAR correlaciona con un descenso en la producción de SCF y CXCL12, indicando que las células CAR son la principal fuente de SCF y CXCL12 en la MO<sup>255</sup>.

## **D. Células IL-7+**

Se ha identificado una subpoblación de fibroblastos reticulares de la MO caracterizada por la expresión de IL-7<sup>194,214,239</sup>. Las células IL-7+ se encuentran distribuidas por toda la MO, son negativas para CD31 y positivas para VCAM-1, CD54, PDGFR $\alpha$  y BP1<sup>194,214,239</sup>.

Se ha reportado que las células pro-B se encuentran asociadas a las células IL-7+, indicando que las células IL-7 formarían un nicho específico para este estadio de desarrollo de las células B<sup>194,214</sup>.

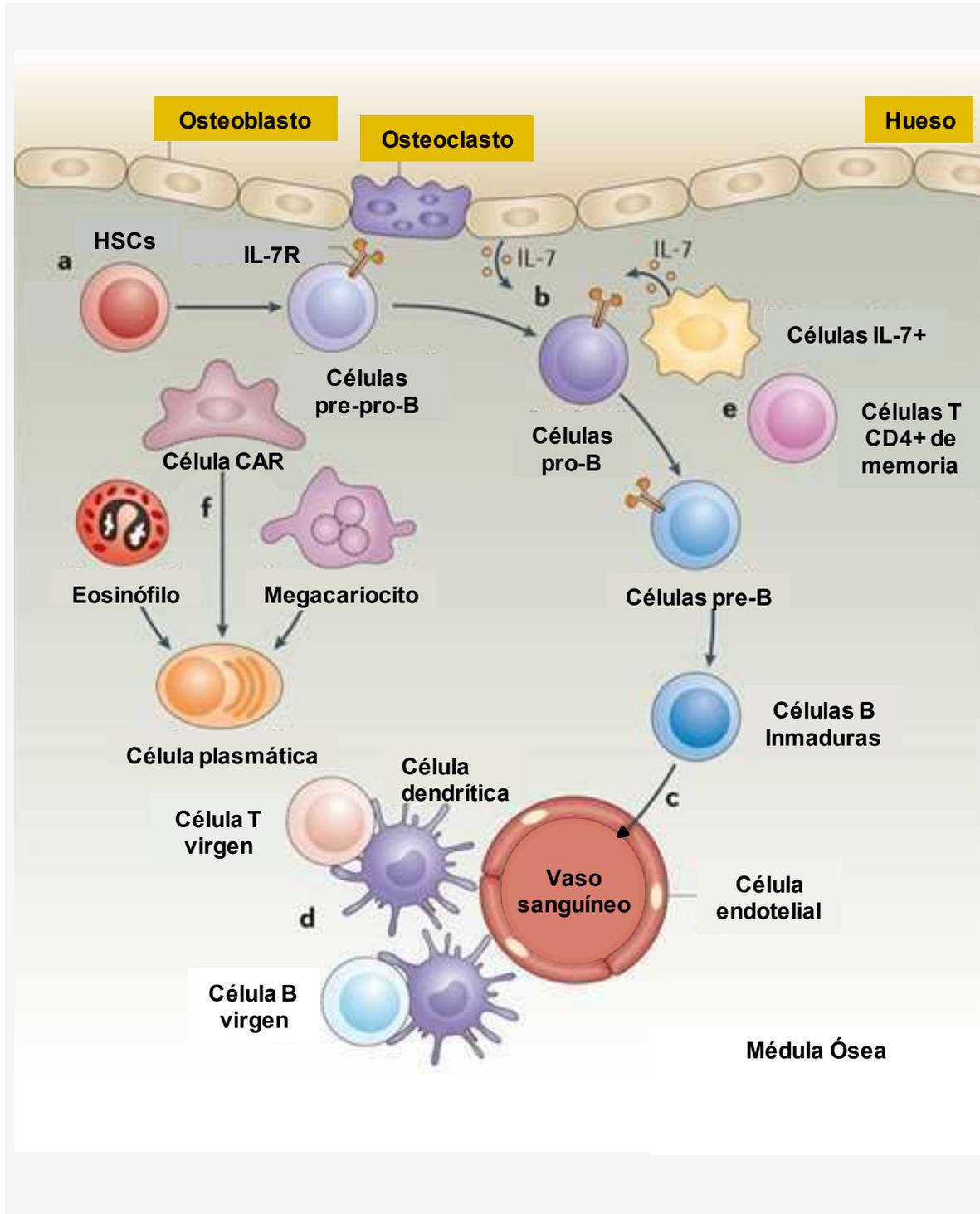
## **E. Células GAL1+**

Recientemente se ha identificado una nueva población de células reticulares positivas para galectina-1, que funcionaría como nicho específico para las células pre-B. Las células GAL1+ son negativas para VCAM-1, PDGFR $\alpha$ , BP1, Sca-1 y nestina y positivas para CD54 y CD31. A pesar de que las células GAL1+ expresan CD31, carecen de CD34 o Tie-2 indicando que no pertenecen al linaje de células endoteliales<sup>239</sup>.

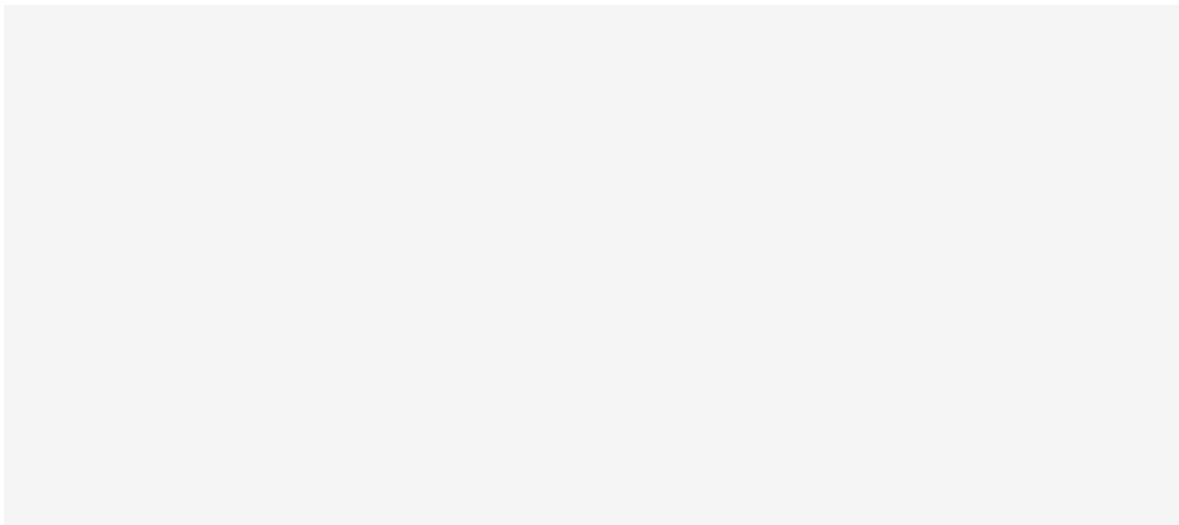
El conjunto de los estudios sobre las CE y su influencia en la linfopoyesis B ha sugerido la presencia de nichos estromales específicos para cada uno de los estadios de desarrollo de los linfocitos B, los cuales tendrían una localización anatómica particular. Estos nichos estromales podrían estar involucrados en la regulación de la transición de los linfocitos B de un estadio de diferenciación al siguiente<sup>194,214,239</sup>.

Actualmente se propone que conforme avanzan en su desarrollo, los linfocitos B se van desplazando entre los distintos nichos<sup>194,214,239</sup> (figura D). Las células pre-pro-B que están en contacto con las células CAR, se desplazarían hacia el nicho formado por las células IL-7+ diferenciándose a células pro-B. Luego las células pro-B se dirigirían al nicho formado por las células GAL1+ para diferenciarse a células pre-B<sup>194,214,239</sup>. Por el momento no se ha identificado un nicho específico para las células B inmaduras. En cambio, se ha reportado que las células B maduras se encuentran asociadas a CDs perivasculares mientras que las

células plasmáticas contactan con las células CAR y dependen de distintos factores de sobrevivencia secretados por las células CAR, megacariocitos y eosinófilos<sup>194,214,238</sup>.



**Figura D. Nichos celulares para los linfocitos B.** Los distintos estadios de desarrollo de las células B están asociados a nichos celulares específicos. Las células madres hematopoyéticas (HSCs) y las células pre-pro-B están en contacto con las células CAR (**a**), mientras que las células pro-B se localizan junto a las células IL-7+ (**b**). Las células B inmaduras abandonan la médula ósea a través de los vasos sanguíneos para completar su maduración en el bazo (**c**). Las células B y T vírgenes se encuentran en un nicho perivascular constituido por una red de células dendríticas (**d**). Las células T CD4+ de memoria residen cerca de las células IL-7+ y se encuentran generalmente en un estado quiescente (**e**). Las células plasmáticas también se encuentran asociadas a las células CAR. Las células CAR, los eosinófilos y los megacariocitos secretan factores que favorecen la supervivencia de las células plasmáticas (**f**). Adaptado de Francois E. Mercier, Christine Ragu y David T. Scadden. *Nat Rev Immunol* 2011; 12: 49–60<sup>238</sup>.



## **Órganos linfoides secundarios**

Los órganos linfáticos secundarios son estructuras especializadas diseñadas para filtrar la sangre y la linfa y promover las respuestas inmunes apropiadas contra numerosos antígenos pertenecientes a una amplia gama de microorganismos patógenos. La compartimentación estratégica de los linfocitos B y T en estos órganos y los mecanismos altamente regulados que maximizan la captura, el procesamiento y la distribución de los antígenos a las células inmunes, son componentes que han evolucionado para maximizar la probabilidad que células B y T específicas para un antígeno se encuentren con el antígeno e inicien las respuestas inmunes apropiadas<sup>256</sup>.

Las respuestas inmunes humorales dependen del encuentro de la célula B con su antígeno, la interacción con las células T<sub>c</sub>, la proliferación y diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos de baja afinidad o luego de la formación de CG a células plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad y células B de memoria. Cada uno de estos eventos ocurre en diferentes subcompartimentos de los órganos linfáticos donde se encuentran distintos tipos de CE. Las células B deben migrar de nicho en nicho de una manera rápida y altamente regulada para poder montar una respuesta efectiva. La quemoquina CXCL13 juega un rol central atrayendo a los linfocitos B hacia los folículos, mientras que las quemoquinas sintetizadas por las zonas T atraen a las células B activadas hacia las mismas<sup>256</sup>.

Los órganos linfáticos secundarios incluyen a los ganglios linfáticos (GL), el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas.

### **Ganglios linfáticos**

Los GL son pequeños agregados nodulares de tejido rico en linfocitos que se distribuyen a lo largo de los conductos linfáticos por todo el organismo.

Cada GL está rodeado por una cápsula fibrosa y presenta dos regiones: una corteza externa y una médula interna (Figura E). En la corteza, se distingue una zona profunda adyacente a

la médula rica en linfocitos T denominada paracorteza (zona T) y más superficialmente se encuentran las áreas ricas en linfocitos B (zona B), constituidas por los folículos primarios y secundarios, los cuales se caracterizan por la presencia de CG.

La zona T es una región rica en CE denominadas fibroblastos reticulares (FRs) las cuales sintetizan fibras reticulares formando una red que contiene a los linfocitos T y a las CDs<sup>257</sup>. Los FRs sintetizan altas cantidades de las quemoquinas CCL19 y CCL21, atrayendo de esta manera a los linfocitos T vírgenes y a las CDs los cuales expresan el receptor para estas quemoquinas CCR7<sup>258-260</sup>.

Por su parte, los folículos presentan dos poblaciones de CE que forman las redes reticulares: las CDF, que presentan una localización central<sup>261,262</sup> y las células reticulares marginales (CRM), de localización mas periférica<sup>263-264</sup>. Las CE foliculares secretan grandes cantidades de CXCL13 que atraen a los linfocitos B vírgenes hacia los folículos a través de su receptor CXCR5<sup>260-264</sup>.

La segregación anatómica de los linfocitos T y B garantiza que estas poblaciones celulares se mantengan separadas hasta el momento en que deben interactuar. Después de la estimulación antigénica, los linfocitos T y B varían la expresión de los distintos receptores de quemoquinas para poder migrar y encontrarse para interactuar. De manera de que luego de la activación, las células B incrementan la expresión de CCR7 para migrar hacia las zonas T, mientras que los linfocitos Tc activados disminuyen la expresión de CCR7 ubicándose en el límite entre los folículos y las zonas T<sup>265,266</sup>.

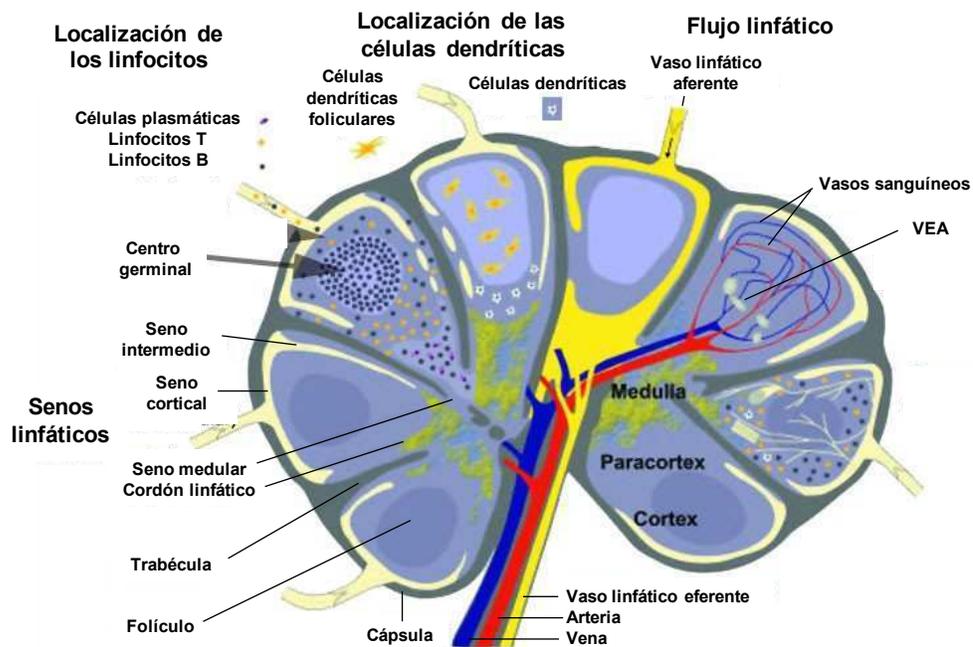
Por su parte la médula, es un laberinto de senos linfáticos drenantes separados por cordones medulares que contienen células plasmáticas, algunos macrófagos y linfocitos T de memoria.

Inmediatamente por debajo de la cápsula se encuentra el seno cortical, donde los vasos linfáticos aferentes descargan su contenido. Además, el seno cortical junto al seno medular albergan a la mayoría de los macrófagos, los cuales capturan y fagocitan a las grandes partículas que penetran en el ganglio a través de la linfa.

Si bien los antígenos pueden ser transportados pasivamente por la linfa hasta los GL, la mayoría penetra en los GL a través de CDs. Las CDs capturan a los antígenos microbianos en el sitio de infección y migran hacia los GL, ingresando a los mismos por medio de vasos

linfáticos aferentes. La linfa que penetra en los GL difunde a través del estroma y las CDs portadoras del antígeno se dirigen hacia las zonas T. El resultado de la captación del antígeno es la concentración del mismo en los GL y su presentación a los linfocitos T específicos.

Por su parte, los linfocitos T y B vírgenes abandonan la circulación y penetran en el estroma de los GL a través de vasos especializados denominados vénulas del endotelio alto (VEA)<sup>267</sup>.



**Figura E. Representación esquemática de la organización de los ganglios linfáticos.** La corteza del ganglio está constituida principalmente por linfocitos B organizados en folículos primarios o secundarios. Estos folículos también contienen a las células dendríticas foliculares, encargadas de la migración de los linfocitos B hacia los mismos. Los linfocitos T se localizan en la corteza y en la paracorteza donde interactúan con las células dendríticas. La región central, la médula, contiene mayoritariamente células plasmáticas y linfocitos B. Las células entran a los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos aferentes o a través de las vénulas del endotelio alto (VEA) y salen por los vasos linfáticos eferentes. Adaptado de Katrin S. Blum y Reinhard Pabst. *J Anat* 2006; **209**: 585-595.

## Bazo

El bazo es uno de los órganos principales que filtran la sangre, situado en una posición privilegiada para capturar antígenos y permitir que las células tanto del sistema inmune innato como del adaptativo respondan rápidamente a patógenos de la sangre<sup>257</sup>.

El bazo está rodeado por una cápsula fibrosa a partir de la cual nacen trabéculas que atraviesan el tejido proporcionando un soporte para el órgano y su vasculatura<sup>257</sup>.

La sangre penetra en el bazo a través de la arteria esplénica en la región del hilio, la cual se ramifica en arteriolas centrales que están rodeadas por los compartimentos linfoides organizados conocidos como pulpa blanca<sup>257</sup>. Las arteriolas centrales se ramifican en numerosas y pequeñas arteriolas foliculares en la pulpa blanca, las cuales dirigen el flujo sanguíneo al seno marginal<sup>155</sup>. Este seno marginal separa la pulpa blanca de la ZM<sup>268</sup>, que constituye la interfaz entre la pulpa blanca y la pulpa roja del bazo<sup>155</sup>(Figura F).

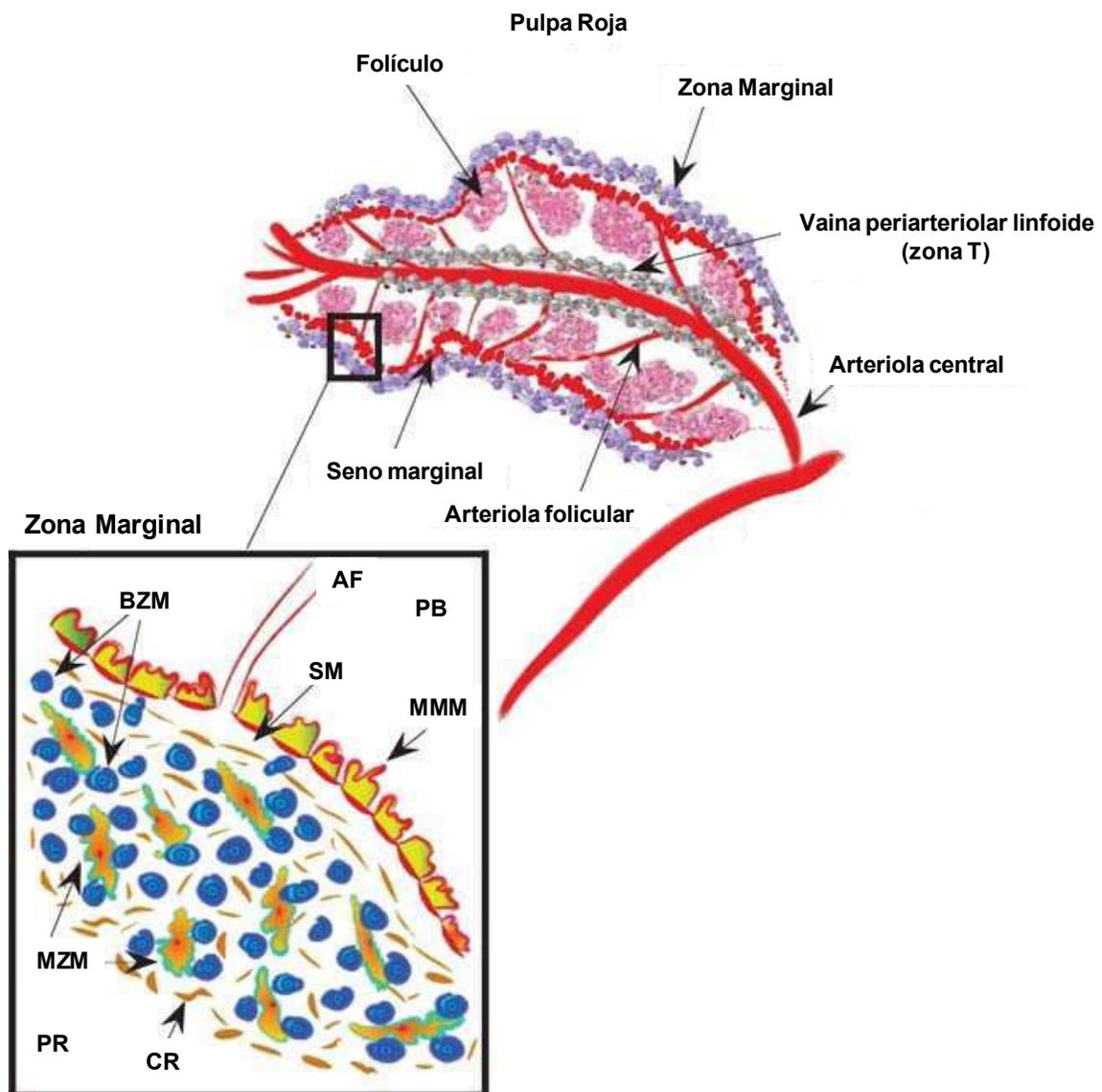
En la pulpa blanca, las arteriolas centrales están rodeadas concéntricamente por una vaina periarteriolar linfoide, que son las zonas T, y por los folículos de células B. Las zonas T en el bazo contienen a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y a las CD, que están sostenidos por la red de FRs. En los folículos de células B, las células B están sostenidas por la red central de CDF y la red periférica de CRM, situada por debajo del seno marginal<sup>257,263,264</sup>.

En cuanto a la pulpa roja está constituida por un entramado reticular denso conformado por fibras reticulares, FR y macrófagos que se encargan del recambio de los glóbulos rojos y de eliminar las bacterias<sup>257</sup>.

La ZM contiene distintos tipos celulares, entre ellos, las células B de la ZM, los macrófagos de la ZM (MZM), los macrófagos metalofílicos (MMM) y distintas subpoblaciones de CDs embebidas en una densa red de CE<sup>269</sup>. Los antígenos, partículas y patógenos que penetran en el bazo a través de la sangre son fagocitados por los MZM, mientras que las células B de la ZM y las CDs pueden migrar hacia la pulpa blanca para transportar o presentar los antígenos a las células B y T respectivamente<sup>257</sup>.

La mayoría de los linfocitos vírgenes que penetran en el bazo desembocan en el seno marginal y son guiados a través del gradiente de quemoquinas hacia la pulpa blanca<sup>155</sup>. Al igual que ocurre en los GL, los linfocitos B y T están anatómicamente separados en el bazo

por mecanismos similares a los que operan en los GL. En respuesta a las quemoquinas CCL19 y CCL21 los linfocitos T son guiados hacia las zonas T, mientras que la quemoquina CXCL13 dirige a los linfocitos B hacia los folículos<sup>258,270</sup>. Por otro lado, la ubicación de las células B en la ZM requiere de la señalización mediada por S1P1, que contrarresta la influencia del gradiente de CXCL13 de reclutar a las células B hacia los folículos<sup>152,153</sup>.



**Figura F. Representación esquemática de la arquitectura del bazo.** Las arteriolas centrales están rodeadas concéntricamente por la vaina periarteriolar linfoide, que corresponde a la zona de células T, y por los folículos de células B. Estas arteriolas se ramifican en arteriolas foliculares que desembocan en el seno marginal. La zona marginal se encuentra entre el seno marginal y la pulpa roja del bazo. El recuadro representa una ampliación de la zona marginal. AF: arteriola folicular; CR: célula reticular; PR: pulpa roja; SM: seno marginal; MMM: macrófagos metalofílicos de la zona marginal; BZM: células B de zona marginal; MZM: macrófagos de la zona marginal; PB: pulpa blanca. Adaptado de Shiv Pillai, Annaiah Cariappa y Stewart T. Moran. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 161-196.

## Catepsina L

El mantenimiento de un organismo saludable se basa en gran medida en el control de la biosíntesis, maduración, función y degradación final de las proteínas. Las enzimas proteolíticas contribuyen en estos procesos mediante el clivaje de enlaces peptídicos. Para que los distintos eventos proteolíticos ocurran de una forma selectiva y controlada, el genoma humano codifica para más de 550 proteasas y más de 200 inhibidores de proteasas<sup>271,272</sup>.

Las proteasas pueden ser subdivididas en cinco categorías: metaloproteasas, cisteín-proteasas, serín-proteasas, aspartato-proteasas y treonín-proteasas<sup>273</sup>.

Un tipo especial de proteasas lisosomales son las catepsinas. Las catepsinas se clasifican según su mecanismo de acción en serín (catepsinas A y G), aspartato (catepsinas D y E) y cisteín (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y Z) catepsinas<sup>274</sup>. La mayoría de las catepsinas son endopeptidasas, mientras que algunas también se comportan como exopeptidasas<sup>275,276</sup>. Todas las catepsinas son sintetizadas como precursores inactivos. La endopeptidasas se activan por autólisis a pH ácido en los lisosomas y las exopeptidasas por endopeptidasas<sup>276</sup>.

En general, las cisteín catepsinas son estables en compartimentos celulares ácidos como los lisosomas y endosomas, y son capaces de clivar eficientemente una amplia variedad de sustratos. Sin embargo, ratones KO para diferentes catepsinas no muestran defectos en la degradación de proteínas en el compartimiento endolisosomal, lo que sugiere que estas proteasas presentan solapamiento funcional en dicho compartimento<sup>277-279</sup>.

Las cisteín proteinasas lisosomales han sido consideradas por mucho tiempo enzimas con funciones exclusivas en la degradación terminal de las proteínas en el compartimento lisosomal<sup>280</sup>. Esta idea estuvo basada en su gran abundancia en los lisosomas, su amplia distribución tisular, y porque una gran parte de la degradación proteolítica intracelular puede ser suprimida por inhibidores específicos de las cisteín proteasas<sup>281</sup>. A pesar de ello, durante la última década, se ha descubierto que las catepsinas desempeñan funciones importantes y específicas tanto en el espacio extracelular como en otros compartimentos celulares, tales como en las vesículas secretorias<sup>282,283</sup>, en el citosol<sup>284,285</sup>, y en el núcleo<sup>286</sup>.

Las catepsinas se sintetizan con un péptido señal N-terminal que las dirige hacia el lumen del retículo endoplasmático (RE). El péptido señal es removido en el RE y se produce una N-glicosilación de la proteína que resulta en la adición de muchos residuos de manosa. Las catepsinas destinadas a los lisosomas se dirigen hacia el aparato de Golgi donde se produce la fosforilación de las manosas. Esta señal dirige a la proteína hacia los endosomas. Tras la acidificación en los endosomas, las catepsinas se activan y comienza el procesamiento proteolítico el cual produce una cadena pesada y una liviana. En la catepsina-L (CTSL), la cadena pesada (24/25 kDa) y la liviana (6 kDa) se encuentran unidas entre sí por un puente disulfuro.

Adicionalmente, una pequeña proporción de las catepsinas (aproximadamente el 5%) no es dirigida a los lisosomas, ya que las manosas no son fosforiladas, y por lo tanto son secretadas como proenzimas.

Además, por splicing alternativo<sup>287</sup>, se producen catepsinas que carecen del péptido señal que las dirige al RE y pueden localizarse en el núcleo<sup>286</sup> y en las mitocondrias<sup>288</sup>.

Tanto la síntesis como la secreción de la CTSL son reguladas por múltiples factores tales como hormonas, factores de crecimiento y otras proteínas lisosomales<sup>289</sup>. Una vez activada, la CTSL puede tener un enorme potencial degradativo por lo cual su actividad debe ser finamente regulada. La actividad de la CTSL es en parte controlada por inhibidores de cisteín-proteasas lisosomales como las estefinas, cistatinas y quininógenos. Las estefinas son inhibidores intracelulares, mientras que las cistatinas y quininógenos inhiben la actividad extracelular de la CTSL<sup>290</sup>. Adicionalmente, se ha descrito que existen otros inhibidores que poseen dominios de tiroglobulina tipo I, como la tirotropina o el fragmento p41 de la cadena invariante, que actúan específicamente sobre la actividad de la CTSL<sup>291</sup>. Contrariamente, se ha descrito que el IFN- $\gamma$  incrementa la actividad de la CTSL en líneas celulares derivadas de monocitos/macrófagos<sup>292</sup>.

## Funciones de la CTSL

La CTSL desempeña un papel importante en el recambio proteico<sup>293</sup>. Además de su rol en el catabolismo de las proteínas, se ha descrito que la CTSL posee funciones específicas en los lisosomas, citoplasma, núcleo, mitocondrias y en el espacio extracelular<sup>294</sup>. Por ejemplo, participa en el procesamiento de hormonas y neuropéptidos<sup>295</sup>, en la degradación de factores de transcripción<sup>286</sup>, en la presentación de antígenos vía el MHC de clase II por las células del epitelio tímico<sup>296</sup> y en la remodelación de la ECM<sup>297,298</sup>. Las diferentes funciones de la CTSL dependen del tipo celular en el cual se expresa y del compartimento celular en el que se localiza.

Datos recientes sugieren que entre las funciones extralisosomales de la CTSL se encuentran la regulación del citoesqueleto en los podocitos renales<sup>299</sup>. En cuanto a sus funciones nucleares, se ha descrito que la CTSL interviene en el procesamiento de la histona H3 durante la diferenciación de las células madre embrionarias<sup>300</sup> y en los fibroblastos es capaz de clivar al factor de transcripción Cux1<sup>286</sup>.

Por otra parte, la CTSL participa en determinadas funciones fisiológicas, incluyendo la regulación de la homeostasis de la epidermis<sup>301-304</sup>, del ciclo folicular del pelo, de la función cardíaca<sup>305-307</sup> y de la neovascularización inducida por células progenitoras endoteliales<sup>308</sup>. Además, la CTSL actúa en los procesos de reciclado durante el crecimiento axonal y en la formación de sinapsis durante el desarrollo del sistema nervioso central<sup>309</sup>.

Por otro lado, la CTSL también es secretada al medio extracelular donde participa del remodelado de la ECM. En este sentido, la CTSL ha demostrado ser una de las más potentes colagenasas y elastasas<sup>310,311</sup>. Además, también es capaz de degradar otros componentes de la ECM como laminina y fibronectina<sup>312</sup>.

Finalmente, en lo que respecta al sistema inmune, se ha demostrado que la CTSL interviene tanto en la degradación de la cadena invariante (Ii)<sup>313</sup>, como en el procesamiento de los péptidos presentados por las células del epitelio tímico cortical en el contexto del MHC de clase II<sup>296</sup>. Por otra parte, se ha reportado que la expresión tímica de la CTSL es esencial para el desarrollo de las células NK<sup>314</sup>.

## Patologías asociadas a CTSL

Tanto la ausencia de actividad de CTSL como su sobreexpresión conllevan a distintos tipos de alteraciones. El uso de ratones KO para CTSL ha proporcionado la mayoría de la información sobre aquellas complicaciones que produce la ausencia de CTSL<sup>315</sup>.

Como mencionamos previamente, la CTSL es esencial en el procesamiento de la cadena li por las células corticales del epitelio tímico, por lo cual los ratones deficientes en CTSL muestran un defecto en la selección positiva de los timocitos T CD4<sup>+313,316,317</sup>.

Por otro lado, ratones deficientes en CTSL desarrollan pérdida del pelo periódica, con alteraciones en la morfogénesis y en el ciclo del folículo piloso; junto con hiperplasia e hiperqueratosis de la epidermis<sup>301-303</sup>. Ambas se atribuyen a una hiperproliferación de las células epiteliales del folículo del pelo y de los queratinocitos basales epidérmicos.

Además, ratones KO para CTSL presentan una espermatogénesis anormal<sup>318</sup>, deterioro de la función tiroidea<sup>319</sup> y al año de edad desarrollan una miocardiopatía dilatada<sup>306</sup>.

Se ha reportado que ratones deficientes en CTSL desarrollan la enfermedad poliquística renal como consecuencia de la acumulación de Cux1<sup>320</sup>. Este factor de transcripción, en condiciones normales reprime a los inhibidores de las ciclinas kinasas p21/p27. En ausencia de CTSL, disminuye el procesamiento de Cux1 y por ende se acumula, reprimiendo a p21/p27 y aumentando la proliferación celular.

Por otro lado, la deficiencia combinada de CTSL y catepsina B en ratones es letal debido a una atrofia cerebral<sup>321</sup>.

Se ha observado que las complicaciones más serias debidas a la deficiencia en CTSL (miocardiopatía dilatada, hiperqueratosis y la espermatogénesis anormal) no se producen en los ratones heterocigotas<sup>301</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que la CTSL está sobreexpresada en una variedad de tumores malignos<sup>322,323</sup>: carcinomas de mama, pulmón, estómago, colon, cabeza y cuello, melanomas y gliomas. La acidificación del microentorno tumoral, debido al aumento de la glicólisis anaeróbica, favorece la actividad extracelular de la CTSL<sup>324</sup>. Cuando su actividad extracelular se incrementa, la adhesión célula-célula disminuye y aumenta la degradación

de distintos componentes de la ECM<sup>312,322-326</sup>. Por lo tanto, la CTSL parecería jugar un papel importante en los procesos de invasión y migración tumorales.

## **Rol de la CTSL en el sistema inmune**

### **A. Procesamiento y presentación antigénica en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II**

Las moléculas del MHC de clase II son expresadas únicamente por un grupo reducido y especializado de células: las CPAs. Las principales CPAs incluyen a las CD4, macrófagos, linfocitos B y células epiteliales de la corteza tímica. La presentación de péptidos asociados al MHC de clase II a partir de antígenos endocitados, supone la degradación proteolítica de los mismos a fragmentos peptídicos en los endo-lisosomas y la unión de los mismos a las moléculas del MHC de clase II. Por su parte, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del MHC de clase II son sintetizadas y ensambladas en el RE<sup>327</sup>. Con el objeto de prevenir la unión prematura de los péptidos presentes en el RE con las moléculas del MHC de clase II, los heterodímeros  $\alpha\beta$  de clase II se asocian con la cadena Ii, una molécula chaperona multifuncional<sup>328</sup>. Esta cadena induce la formación de una estructura trimérica  $(\alpha\beta-Ii)_3$  que es direccionada a través del aparato de Golgi hasta los endo-lisosomas<sup>329</sup>, donde se encuentran los fragmentos peptídicos. En los endo-lisosomas la cadena Ii es degradada obteniéndose un residuo de 24 aminoácidos denominado CLIP<sup>330</sup> (class II-associated invariant chain peptide) que ocupa el sitio de unión a los péptidos antigénicos hasta que es procesado proteolíticamente. Mediante la acción de la molécula HLA-DM, se remueve CLIP permitiendo que el sitio sea accesible a los fragmentos peptídicos antigénicos<sup>331</sup>. Las moléculas del MHC de clase II se asocian con los péptidos antigénicos y son transportadas a la superficie celular donde presentan los mismos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>332</sup>.

Estudios utilizando inhibidores específicos sugieren que las cisteín proteasas son responsables de los pasos de la degradación de la cadena Ii hasta el péptido CLIP<sup>333</sup>.

Mediante la utilización de animales KO para catepsina S<sup>334,335</sup> y CTSL<sup>313</sup> se ha demostrado que estas proteasas juegan un rol importante en la presentación antigénica en el contexto del MHC de clase II. Se observó que la CTSL es importante en la presentación de péptidos propios en el contexto del MHC de clase II en las células del epitelio tímico cortical<sup>313</sup>, mientras que la catepsina S participa en la presentación de péptidos antigénicos en el contexto del MHC de clase II en los linfocitos B y las CD4<sup>+</sup> de la periferia<sup>333-335</sup>. Nakagawa y col<sup>313</sup>. describieron que los ratones KO para CTSL presentan una reducción de entre el 60 y el 80% en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> tanto en el timo como en la periferia. Los ratones KO para CTSL muestran una acumulación de los fragmentos de la cadena Ii en el estroma tímico y un incremento de CLIP asociado a las moléculas del MHC de clase II en la superficie celular, sugiriendo que la CTSL clivaría a CLIP en las células del epitelio tímico<sup>313</sup>. En concordancia con datos reportados por otros autores<sup>313</sup>, se ha demostrado en nuestro laboratorio<sup>317</sup> que ratones portadores de una mutación inactivante en el gen que codifica para la CTSL muestran una alteración en las etapas tempranas de la selección positiva en el contexto de las moléculas del MHC de clase II, presentando una disminución en el número de timocitos CD4<sup>+</sup>.

Por otro lado, las catepsinas han sido implicadas en la fragmentación de los péptidos antigénicos presentados en el contexto de las moléculas del MHC de clase II<sup>336</sup>. En este sentido, se ha descrito que la CTSL interviene en la generación de epitopes antigénicos en los endosomas y en la degradación de moléculas accesorias<sup>334</sup>. Estudios realizados comparando ratones deficientes para Ii y MHC de clase II, mostraron que si la diversidad y el nivel de expresión de los complejos péptidos propios-MHC II se reducen notablemente se produce una disminución significativa en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>337-339</sup>. Se ha observado, que en los ratones deficientes en CTSL la selección positiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> está alterada tanto en el haplotipo I-A<sup>b</sup> -cuya presentación antigénica es dependiente de la degradación del Ii- como en el haplotipo I-A<sup>q</sup> -donde la presentación antigénica es independiente de la degradación de Ii<sup>296</sup>. Utilizando animales doble KO para CTSL y Ii se observó una disminución aún más significativa en la selección positiva de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, similar a los niveles detectados en animales deficientes en las MHC de clase II.

Todo esto indicaría que la CTSL juega un rol en la presentación de péptidos en el contexto de las MHC de clase II en las células del epitelio tímico, actuando tanto en la degradación de la cadena Ii<sup>313</sup> como en la generación de los fragmentos peptídicos presentados por las células epiteliales de la corteza tímica en el contexto de las MHC de clase II<sup>296</sup>.

## **B. Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>: Influencia de la CTSL en la población de células T y en la composición de la ECM de los órganos linfoides**

### ***B.1. Origen de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>***

Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> son portadores de una mutación autosómica recesiva en el gen que codifica para la CTSL. El alelo mutante *nakt* (*nkt*) surge en el año 1981 en el laboratorio de animales de la Universidad Martin-Luther en Halle-Wittenberg, Alemania, en un stock derivado del Fundador irradiado N°372. En 1991, ratones portadores del alelo *nkt* fueron introducidos en el bioterio del Instituto Pasteur, Francia, donde fueron cruzados por algunas generaciones con la cepa 129/Sv/Pas y posteriormente inter cruzados. Esta cepa parcialmente congénica fue designada a partir de entonces NKT/Pas. Posteriormente, a través de un convenio entre el Instituto Pasteur y nuestro Instituto (IMEX-CONICET), se determinó que los ratones *nkt/nkt* presentaban una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 13, a una distancia de entre 30 y 40 cM del centrómero<sup>340</sup>.

Ratones NKT/Pas fueron transferidos al bioterio del IMEX-CONICET donde se retro cruzaron con ratones de la cepa BALB/c. Luego de sucesivas series de retro cruzas/inter cruzas se obtuvieron animales homocigotas para la mutación *nkt* en un background genético BALB/c (ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>). Finalmente en el 2001, Benavides y col. demuestran que la mutación *nkt* corresponde a una delección en el gen que codifica para la CTSL<sup>341</sup>.

El gen *ctsl* murino posee 7400 pb distribuidas en 8 exones y 7 intrones<sup>342</sup>. La delección descrita en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> abarca el final del exón 6 y la mayor parte del exón 7,

dando lugar a un ARNm de 1256 pb, en lugar de las 1374 que posee el ARNm normal para CTSL<sup>341</sup>.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> son capaces de sintetizar una forma mutada de la CTSL<sup>343</sup>. Sin embargo, dado que la delección en el gen *ctsl* abarca los residuos de aminoácidos que forman el puente disulfuro entre la cadena pesada y la liviana (esencial para la actividad enzimática de la CTSL)<sup>344,345</sup> la proteína sintetizada no es funcional.

## ***B.2. Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>: modelo experimental de la influencia de la CTSL sobre el sistema inmune***

Tal como mencionamos anteriormente, los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> muestran alteraciones en la selección positiva en el contexto de las moléculas del MHC de clase II<sup>317</sup>. Como consecuencia, y al igual que los ratones KO para CTSL, los mutantes CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan una marcada disminución en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> tanto en el timo como en los órganos linfoides periféricos<sup>343</sup>. Por su parte, el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> es normal en el timo mientras que, en correlación con un aumento en su exportación tímica, el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> está aumentado en la periferia<sup>343</sup>.

Se ha demostrado en nuestro laboratorio que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan adenomegalia, con un incremento en el número total de células linfoides en los GL<sup>343</sup>. Como consecuencia de la mayor exportación tímica de células CD8<sup>+</sup>, tanto el porcentaje como el número de células T CD8<sup>+</sup> se encuentran notablemente incrementados en los GL. A pesar de que la producción tímica de las células CD4<sup>+</sup> se encuentra disminuida, el número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> alcanza valores normales en los GL debido a un incremento en su tasa de proliferación basal<sup>343</sup>.

Por otra parte, se demostró que estas alteraciones correlacionan con aumentos en la expresión de distintos componentes de la ECM en los GL, tales como fibronectina, laminina y colágenos tipo I y IV. Contrariamente, el timo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> muestra una marcada disminución en los niveles de expresión de los mismos<sup>343</sup>.

Finalmente, el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presenta una severa disminución en el porcentaje y número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> y un incremento en el porcentaje y número absoluto de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En cuanto a la composición de la ECM del bazo, no se han detectado alteraciones en ninguno de los componentes estudiados<sup>343</sup>.

# Objetivos

## Objetivo general

El estado de inmunocompetencia de un individuo depende del mantenimiento de un conjunto estable de células B y T. Aunque se sabe que existe un control preciso del número y la funcionalidad de las células que componen el pool linfoide, los mecanismos que intervienen en su regulación no han sido aún dilucidados. Una mejor comprensión de los factores que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune puede colaborar en la elaboración de terapias que permitan compensar aquellos procesos donde se pierde este equilibrio, como las inmunodeficiencias asociadas a infecciones, quimioterapia y envejecimiento, así como en los síndromes linfoproliferativos y autoinmunes.

Se ha demostrado que la proteasa lisosomal CTSL ejerce una amplia influencia sobre el sistema inmune. Utilizando como modelo experimental ratones deficientes en CTSL (CTSL<sup>nkt/nkt</sup>), previamente demostramos que la CTSL participa en la regulación del número y composición de las poblaciones celulares T en los órganos linfoides centrales y periféricos. Como consecuencia de alteraciones tempranas en la selección positiva de los timocitos T CD4<sup>+</sup>, los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan una marcada disminución en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> tanto en el timo como en los órganos linfáticos periféricos. Se ha demostrado además que el estroma tímico de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> contribuiría en dicha alteración. Por otro lado, se ha observado que el timo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> es capaz de producir y exportar un mayor número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a la periferia.

En la presente Tesis nos propusimos investigar si la ausencia de actividad de CTSL induce alteraciones en la frecuencia y en el número de células B en los órganos linfoides centrales y periféricos.

## Objetivos específicos

Investigar la influencia de la CTSL sobre la homeostasis de las células B utilizando como modelo experimental ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Para ello analizaremos:

A) La frecuencia y el número de las distintas subpoblaciones de células B presentes en la MO, bazo, GL y SP de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

B) El efecto de la ausencia de CTSL funcional sobre mecanismos homeostáticos involucrados en la regulación del número de células B en la periferia:

B.1. Niveles de proliferación basales de las células B periféricas.

B.2. Niveles de apoptosis basales de las células B periféricas.

C) El rol de la CTSL en la maduración, supervivencia, producción y exportación de linfocitos B de la MO.

C.1. Efecto de la ausencia de actividad de CTSL en el microambiente de la MO sobre los niveles de supervivencia y producción de linfocitos B.

C.2. Efecto de la ausencia de CTSL funcional en los progenitores de células hematopoyéticas de la MO sobre la linfopoyesis B.

# **Materiales y Métodos**

## ***Animales***

Se utilizaron ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> con background genético BALB/c (H-2<sup>d</sup>) con un nivel de retrocruza mayor a N=15<sup>343</sup>. Ratones de la cepa BALB/c (H-2<sup>d</sup>) fueron utilizados como control wild type (wt) en todos los experimentos. En algunos experimentos de trasplante de MO se utilizaron ratones de la cepa CByJ.B6-Tg (UBC-GFP) 30Scha/J (BALB/c-GFP) como dadores de células. Todos los animales fueron criados en el bioterio del IMEX-CONICET, División Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, bajo condiciones libres de patógenos específicos (SPF) y de acuerdo a la guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de EEUU (NIH) (National-Research-Council (ed.). 1996. Guide for the care and use of laboratory animals National Academy Press ed, Washington DC). Para todos los experimentos se utilizaron ratones de 8-12 semanas de edad.

## ***Preparación de las suspensiones celulares***

Tanto los GL como el bazo fueron extraídos y disgregados por pasaje a través de una malla metálica utilizando PBS o DMEM (GIBCO, CA, USA), suplementado con 3% de SFB (Greiner Bio One)<sup>343</sup>. La suspensión de células de GL fue centrifugada a 4°C de manera de cosechar las células en el pellet.

Para la obtención de células de MO, se extrajeron ambos fémures y a través de las epífisis se inyectó PBS o DMEM con 3% de SFB hasta que los huesos estuvieran de un color blanquecino<sup>346</sup>. Las células de la MO se recogieron en tubos falcon para su posterior lavado por centrifugación. Para el aislamiento de células mononucleares a partir de SP, bazo o MO, las suspensiones celulares fueron sembradas sobre una solución de Ficoll-Triyoson ( $\delta$  1,099 g/cm<sup>3</sup>) y luego centrifugadas para recolectar el halo de células mononucleares. El Ficoll remanente fue eliminado mediante dos lavados con PBS o DMEM suplementado con 3% de SFB<sup>186</sup>.

La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Azul Tripán, utilizándose aquellas suspensiones celulares con una viabilidad mayor al 90%.

Para el cálculo del número absoluto de linfocitos de bazo, MO y SP, se realizó un recuento celular con TURK previo a la obtención de células mononucleares por gradiente de Ficoll-Triyoson.

### ***Citometría de flujo***

Las marcaciones se realizaron con anticuerpos monoclonales conjugados a los siguientes fluorocromos: fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), Cy-Chrome (Cy), TruRed o allophycocianina (APC). Se utilizaron los siguientes anticuerpos de BD-Pharmingen (San Diego, CA, USA): anti-HSA (clon M1/69), anti-IgM (clon R6-60.2), anti-IgD (clon 11-26c.2a), anti-LFA-1 (clon M17/4), anti-CD19 (clon 1D3), anti-B220 (clon RA3-6B2), anti-CD43 (clon S7), anti-CD23 (clon B3B4), anti-CD44 (clon IM7), anti-CD21 (clon 7G6), anti-BrdU (clon 3D4). Se utilizó el anticuerpo anti-IgD (clon 11-26c.2a) de Biolegend (San Diego, CA).

Para los controles de isotipo se utilizaron los siguientes anticuerpos (BD-Pharmingen): IgG<sub>1</sub> de rata (clon R3-34); IgG<sub>2</sub> de rata (clon R35-95); IgG<sub>1</sub> de hamster (clon G235-2356); IgG<sub>2</sub> de hamster (clon B81-3), IgG de hamster (clon A19-3).

***Marcación de superficie:***  $1 \times 10^6$  células/100  $\mu$ l de buffer de marcación (PBS, azida sódica 0,1% y SFB 3 %) fueron incubadas con 1  $\mu$ g de anticuerpo durante 30-40 minutos, a 4°C y protegidas de la luz. Las células fueron lavadas (X2) y fijadas con PBS-paraformaldehído 0,5%, conservándose a 4°C y en oscuridad hasta el momento de la adquisición.

Las citometrías de 3 colores fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScan y las de 4 colores en un FACSAria (BD Biosciences). Se utilizó el software CellQuest (BD Immunocytometry Systems) para el análisis de datos, restando los valores de los controles de isotipo. Las células muertas fueron excluidas basándose en los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) celular.

### ***Pulso de bromodeoxiuridina (BrdU) como ensayo de emigración de células de MO***

Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> recibieron durante 2 días un pulso diario de 2 mg de BrdU (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) por vía intraperitoneal (i.p.). Como control interno del tratamiento y para controles de citometría de flujo, se inocularon además ratones con PBS. Al día siguiente de la última inoculación, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los bazos y MO para realizar la citometría. Las células fueron marcadas con anticuerpos de superficie (anti-IgM, anti-IgD, anti-CD43, anti-B220) como se detalló anteriormente. Para la detección intracelular de BrdU se utilizó el kit de marcación intracelular BD Cytotfix/Cytoperm (BD-Pharmingen) y se siguieron las especificaciones del fabricante: seguido de la marcación de superficie, las células fueron lavadas y fijadas-permeabilizadas con el buffer BD Cytotfix/Cytoperm. Luego las células fueron lavadas e incubadas con 30 µg de DNasa I (Sigma) en buffer PBS, NaCl 0,15M, MgCl<sub>2</sub> 4,2M, por 1 hora a temperatura ambiente para exponer la BrdU incorporada en el ADN. Las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo anti-BrdU por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas y adquiridas en el citómetro de flujo.

### ***Ensayos de apoptosis***

Para la detección de células apoptóticas se utilizó yoduro de propidio (IP) o anexina V. El IP se intercala entre las bases del ADN y permite discriminar entre las células que están en proceso de síntesis (S) o han duplicado su contenido de ADN (G2/M), de aquellas que no se están dividiendo (G0/G1) o han perdido parte de su contenido de ADN al entrar en el proceso de muerte celular. Para la tinción con IP (Sigma), las células fueron resuspendidas en PBS con 3% SFB e incubadas con el anticuerpo anti-B220 FITC por 30 minutos. Luego las células fueron lavadas, fijadas con 1 ml de etanol 70% frío y guardadas a 4°C en oscuridad por un mínimo de 18hs. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas en 500µl de solución de tinción (PBS-glucosa 1%, RNasa A (Sigma) 1mg/ml, IP 25 µg/ml). Luego de 30 minutos de incubación a 4°C en oscuridad, las células fueron lavadas y adquiridas en un citómetro de flujo FACScan<sup>343</sup>.

Para la tinción con anexina V (BD Pharmingen), las células fueron incubadas en PBS-3% SFB con los correspondientes anticuerpos de superficie por 30 minutos, lavadas con PBS y resuspendidas en 150  $\mu$ l de buffer anexina V 1X (BD Pharmingen) conteniendo 1  $\mu$ l de anexina V (conjugada a FITC o PE). Luego de 30 minutos de incubación a 4°C en oscuridad, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScan.

### ***Análisis del ciclo celular***

Para el análisis del contenido de ADN celular, se utilizó IP o 7-AAD<sup>347</sup>(BD Pharmingen). La tinción con IP se realizó como se detalla previamente<sup>343</sup>. Para la tinción con 7-AAD, las células fueron marcadas con los correspondientes anticuerpos de superficie, lavadas y fijadas-permeabilizadas con el buffer BD Cytofix/Cytoperm. Luego las células fueron lavadas e incubadas con 30  $\mu$ g de DNasa I en buffer PBS, NaCl 0,15M, MgCl<sub>2</sub> 4,2M, por 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas e incubadas con 20  $\mu$ l de 7-AAD por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las células fueron lavadas y adquiridas en el citómetro de flujo.

Tanto de la marcación con IP como de la de 7-AAD, se obtienen histogramas que representativos del contenido de ADN, pudiéndose describir 3 poblaciones de células de acuerdo a su fase en el ciclo celular: G0/G1, S y G2/M.

### ***Ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC)***

Células de MO ( $1 \times 10^5$ ) fueron cultivadas en un 1 ml de medio semisólido formado por metilcelulosa suplementada con IL-7 (MethoCult M3630 medium, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) en placas de 35 mm. Luego de 7 días de cultivo a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, se enumeraron las colonias de más de 30 células bajo microscopio invertido<sup>348</sup>.

### ***Cultivos de CE de MO***

Células de MO fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en DMEM suplementado con 20% SFB a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> por 24hs. Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS de manera de remover las células no adherentes y se añadió medio de cultivo fresco. Las células adheridas a la placa fueron mantenidas en cultivo hasta alcanzar la confluencia, renovando el medio de cultivo dos veces por semana.

### ***Ensayos de UFC en presencia de CE***

Células de MO fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (1x10<sup>6</sup> cells/ml/pocillo) en DMEM suplementado con 20% SFB en presencia de concentraciones saturantes de rIL-7 (2 ng/ml; R&D Systems) por 4 días, con el fin de obtener una población enriquecida en células pro-B. (>70% de células pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hi</sup>). Las suspensiones celulares enriquecidas en células pro-B (5x10<sup>5</sup>) fueron cultivadas sobre monocapas de CE de MO en presencia de rIL-7 (1 ng/ml) por 3 días más. Las células no adherentes fueron cosechadas, contadas y utilizadas para realizar el ensayo de UFC sobre metilcelulosa suplementada con IL-7. A los 7 días de cultivo, se enumeraron las colonias de más de 30 células<sup>348</sup>.

### ***Ensayos de autorreconstitución de MO***

Ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> y sus controles fueron irradiados con una dosis de radiación ionizante subletal (500 rad). Dos días antes y luego de la irradiación se administró a los ratones agua con antibiótico (2 mg/ml neomicina sulfato). A los 13 días de la irradiación, se extrajeron los bazos y MO para realizar la citometría de flujo y analizar las subpoblaciones de células B en dichos órganos<sup>349</sup>.

### ***Ensayos de trasplante de MO***

Los ratones fueron irradiados con una dosis de radiación ionizante letal (900 rad) e inoculados 24 hs más tarde por vía endovenosa con células de MO ( $2 \times 10^6$ ). En algunos experimentos se utilizaron ratones BALB/c-GFP para investigar el porcentaje de células dadoras involucradas en la reconstitución del pool de células linfoides. Dos días antes y luego de la irradiación se administró a los ratones agua con antibiótico (2 mg/ml neomicina sulfato). A los 12 días del trasplante, se extrajeron los bazos y MO para realizar la citometría de flujo y analizar las subpoblaciones de células B en dichos órganos<sup>93</sup>.

### ***Presentación de los resultados***

Las figuras y tablas contienen, salvo que se indique, resultados representativos de experimentos repetidos de dos a cuatro veces de manera independiente.

### ***Análisis estadístico***

Se utilizó el test *t* de Student de dos colas para determinar la significancia estadística de los resultados. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados indicativos de una diferencia significativa.

# Resultados

## **CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS B PERIFÉRICAS EN LOS RATONES CTSL<sup>nkt/nkt</sup>**

Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> carecen de CTSL funcional como resultado de una delección en el gen *ctsl*<sup>341</sup>. Como explicáramos en la introducción, en nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que los ratones deficientes en CTSL presentan alteraciones en las poblaciones linfoides T en los distintos órganos linfáticos<sup>317,343</sup>.

En estos ratones la selección positiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se encuentra severamente disminuida con la consecuente disminución del número de timocitos CD4<sup>+</sup>. Como resultado, tanto el bazo como los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> muestran una marcada reducción en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan adenomegalia y el número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> de los GL no difiere del de los ratones wt debido a un incremento en los niveles de proliferación basal de las mismas. En cambio en el bazo el número de células T CD4<sup>+</sup> se encuentra severamente disminuido.

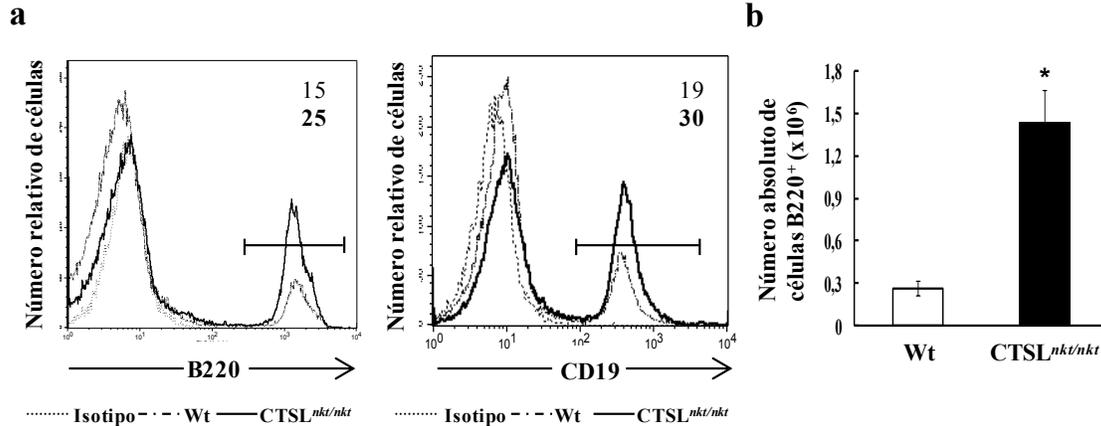
Por otro lado, el timo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> es capaz de producir y exportar una mayor cantidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, con el consecuente aumento tanto en el porcentaje como en el número absoluto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la periferia<sup>343</sup>.

El objetivo de este trabajo fue investigar si la ausencia de actividad de CTSL influencia la maduración y homeostasis de las células B.

### **1.1- Células B de los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>**

Comenzamos investigando la población de linfocitos B en los GL de los ratones deficientes en CTSL.

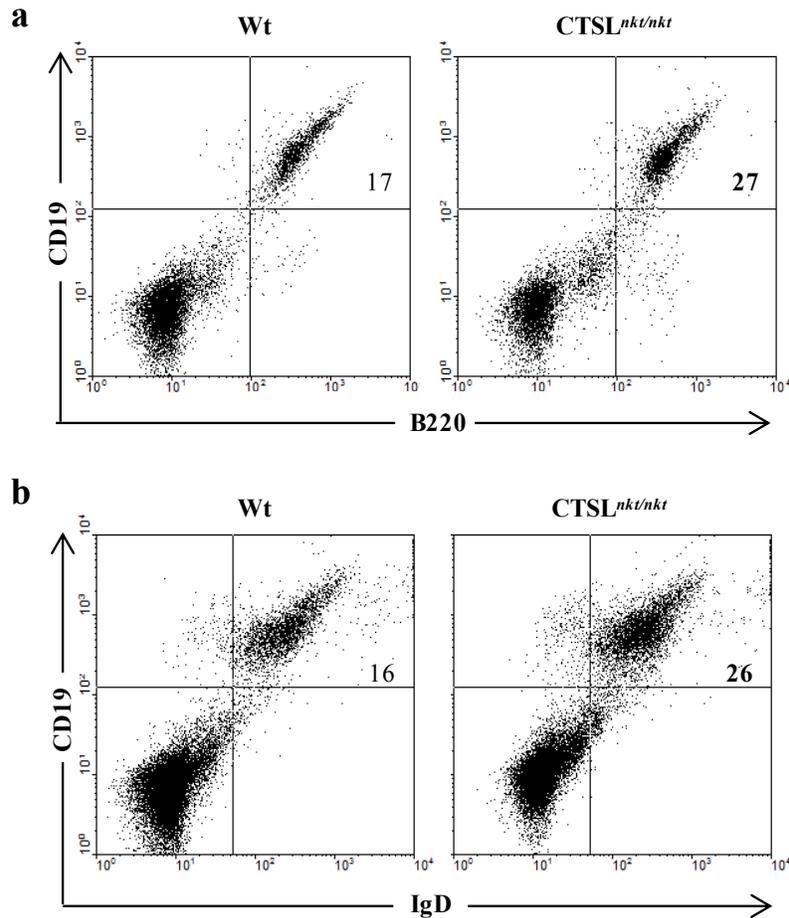
Mediante citometría de flujo analizamos el porcentaje de células positivas para las moléculas de superficie B220 y CD19, marcadores característicos de las células B<sup>29,70</sup>. Los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentaron un incremento significativo en el porcentaje de células B220<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> (Figura 1a) y un marcado incremento en el número absoluto de células B220<sup>+</sup> (Figura 1b).



**Figura 1:** La ausencia de actividad de CTSL induce una alteración en la proporción de células B en los GL. Linfocitos de GL de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcados con anticuerpos anti-B220 y anti-CD19 conjugados a distintos fluorocromos y analizados por FACS. (a) Se muestran histogramas representativos de la expresión de B220 y CD19. Los porcentajes de células B220<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> están indicados. (b) Números absolutos de células B220<sup>+</sup> en los GL de los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p < 0.001$ . Se muestra un experimento representativo de cuatro independientes con resultados similares.

El hecho de que observamos un incremento en la frecuencia y en el número de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (media número absoluto  $\times 10^6 \pm$  DS:  $0.34 \pm 0.01$  en wt vs  $1.69 \pm 0.03$  en CTSL<sup>nkt/nkt</sup>) así como en el de las células CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> (media número absoluto  $\times 10^6 \pm$  DS:  $0.32 \pm 0.01$  en wt vs  $1.63 \pm 0.03$  en CTSL<sup>nkt/nkt</sup>) en los GL de los ratones deficientes en CTSL (Figura 2), nos permitió confirmar el aumento en el número de células B en los GL de estos ratones.

Además las células B de los GL de los ratones deficientes en CTSL no mostraron alteraciones en los niveles de expresión de las moléculas B220, CD19 (Figura 1a), IgD e IgM (datos no mostrados).



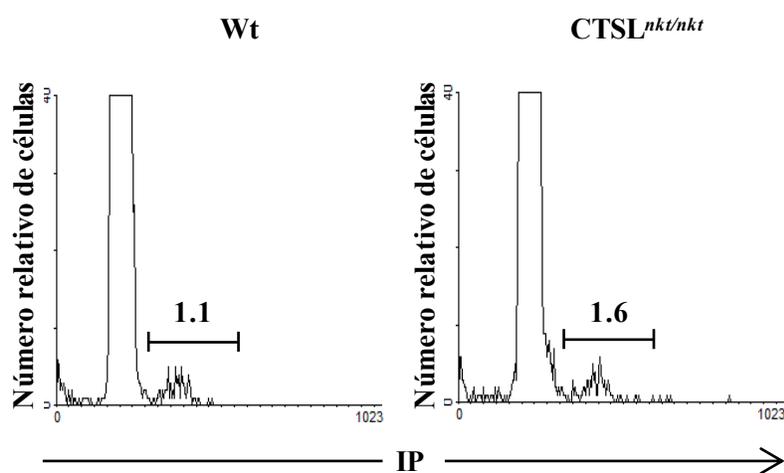
**Figura 2:** Los GL de los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$  presentan un incremento en los niveles de células B. Linfocitos de GL de ratones wt y  $CTSL^{nkt/nkt}$  fueron marcados con anticuerpos anti-B220, anti-CD19 y anti-IgD conjugados a distintos fluorocromos y analizados por FACS. (a) Dot plots representativos de la expresión de B220 y CD19. Los porcentajes de células  $B220^+CD19^+$  están indicados. (b) Dot plots representativos de la expresión de IgD y CD19. Los porcentajes de células  $CD19^+IgD^+$  están indicados. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares (n=4).

### 1.1.1- Mecanismos involucrados en el incremento de células B en los GL de los ratones $CTSL^{nkt/nkt}$

En primer lugar investigamos si el incremento en los niveles de células B en los GL de los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$  estaba asociado con alteraciones en los niveles de proliferación basales.

Mediante el marcado del ADN con yoduro de propidio (IP) y posterior análisis por FACS, medimos el porcentaje de células B220<sup>+</sup> en proliferación.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células B220<sup>+</sup> en proliferación entre los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> y los de sus controles wt (Figura 3 y Tabla 1).

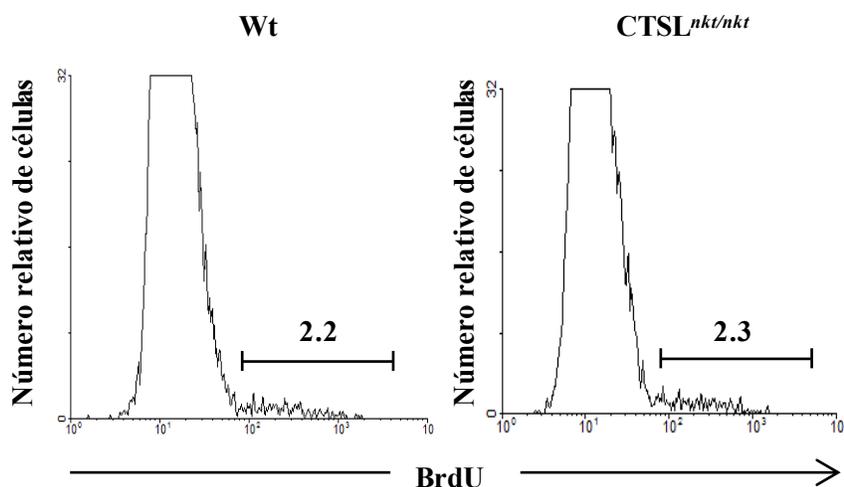


**Figura 3:** Histogramas representativos de los niveles de proliferación basales de la subpoblación de células B220<sup>+</sup> de los GL. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup> en proliferación. Los valores son representativos de tres experimentos independientes (n=4).

	% de proliferación basal de células B
Wt	1.10 ± 0.30
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	1.60 ± 0.66

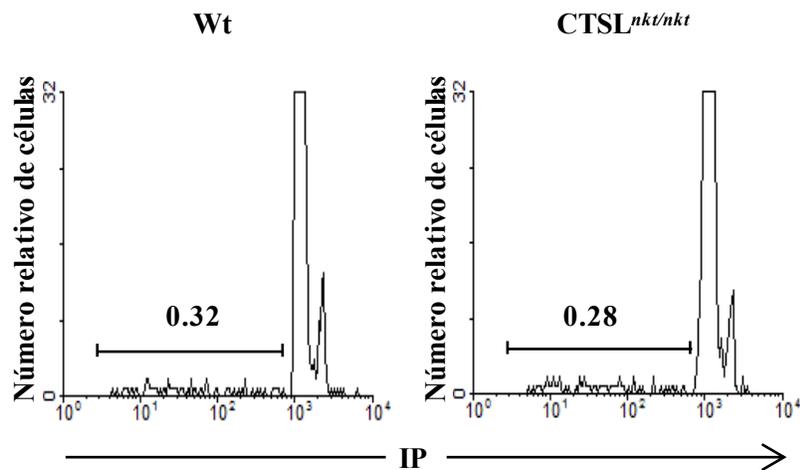
**Tabla 1:** Niveles de proliferación basales de células B220<sup>+</sup> en los GL de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Linfocitos de GL fueron marcados con IP y el anticuerpo anti-B220 FITC y analizados por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Se obtuvieron resultados similares cuando los animales fueron inoculados i.p. con BrdU y se determinó el porcentaje de células positivas para BrdU dentro de la población de células B220<sup>+</sup> (Figura 4).



**Figura 4:** Niveles de proliferación basal de células B en los GL. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron inoculados i.p. con BrdU durante 2 días consecutivos. Luego células de GL fueron extraídas y marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-BrdU para su posterior análisis por FACS. Se muestran histogramas representativos de los niveles de proliferación basal de la población de células B220<sup>+</sup> de los GL. Se indican los porcentajes de incorporación de BrdU dentro de la población de células B220<sup>+</sup>. Los valores son representativos de tres experimentos independientes (n=4).

Luego nos preguntamos si el aumento de células B en los GL de los ratones deficientes en CTSL podría deberse a una disminución en los niveles de apoptosis basales. Mediante marcación con IP y posterior análisis por FACS, medimos el porcentaje de células B220<sup>+</sup> en apoptosis. No observamos diferencias significativas en los niveles de apoptosis basales de las células B220<sup>+</sup> de los GL entre ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 5 y Tabla 2).



**Figura 5:** Histogramas representativos de los niveles de apoptosis basales de la subpoblacion de células B220<sup>+</sup> de los GL. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup> en apoptosis. Los valores son representativos de tres experimentos independientes (n=4).

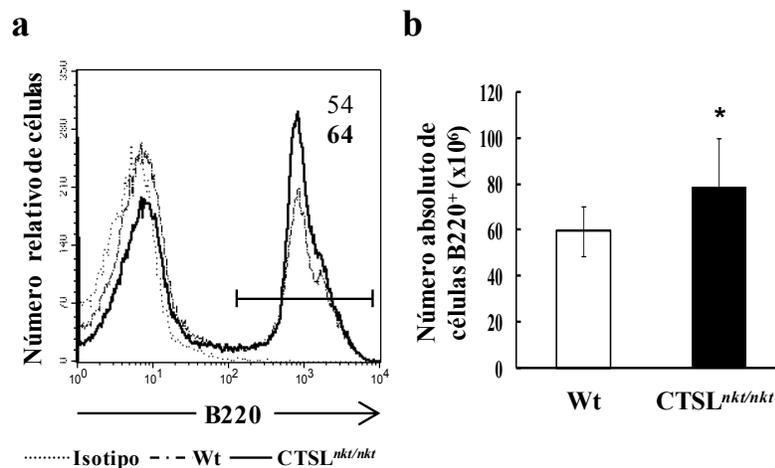
	% de apoptosis basal de células B
Wt	0.32 ± 0.06
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	0.28 ± 0.04

**Tabla 2:** Niveles de apoptosis basal de células B220<sup>+</sup> en GL de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Linfocitos de GL fueron marcados con IP y el anticuerpo anti-B220 FITC y analizados por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Estos resultados indican que el incremento en el número de células B en los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no está relacionado con alteraciones en sus niveles de proliferación o apoptosis basales y sugieren además que el aumento en el número de linfocitos B en los GL podría deberse a que un mayor número de linfocitos B entra y permanece en los GL de estos ratones. Como se discutirá más adelante este hecho podría estar relacionado a incrementos en los niveles de expresión de distintos componentes de la ECM en los GL de los ratones deficientes para CTSL.

## 1.2- Células B del bazo en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>

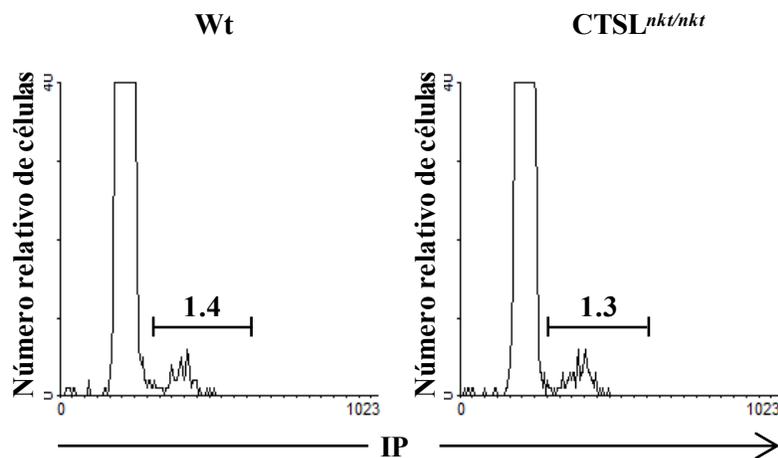
Investigamos si el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> también presentaba alguna alteración en la población de células B220<sup>+</sup>. Mediante FACS observamos un incremento significativo tanto en el porcentaje como en el número absoluto de células B220<sup>+</sup> en el bazo de los ratones deficientes para CTSL (Figura 6a-b), aunque el incremento en el número absoluto de linfocitos B220<sup>+</sup> fue mucho menor que el registrado en los GL.



**Figura 6:** Aumento de células B en el bazo de los ratones deficientes en CTSL. Células mononucleares de bazo de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcados con el anticuerpo anti-B220 y analizadas por FACS. (a) Se muestran histogramas representativos de la expresión de B220. Los porcentajes de células B220<sup>+</sup> están indicados. (b) Números absolutos de células B220<sup>+</sup> en el bazo de los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p$ <0.01. Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

### 1.2.1- Mecanismos involucrados en el incremento de células B en el bazo de los ratones *CTSL<sup>nkt/nkt</sup>*

Investigamos entonces si el incremento de las células B220<sup>+</sup> en el bazo de los ratones *CTSL<sup>nkt/nkt</sup>* podría estar relacionado con una mayor tasa de proliferación basal de estas células. Mediante marcación con IP y posterior análisis por FACS medimos el porcentaje de células B220<sup>+</sup> en proliferación. No observamos alteraciones en los niveles de proliferación basales de las células B220<sup>+</sup> esplénicas de los ratones *CTSL<sup>nkt/nkt</sup>* (Figura 7 y Tabla 3).

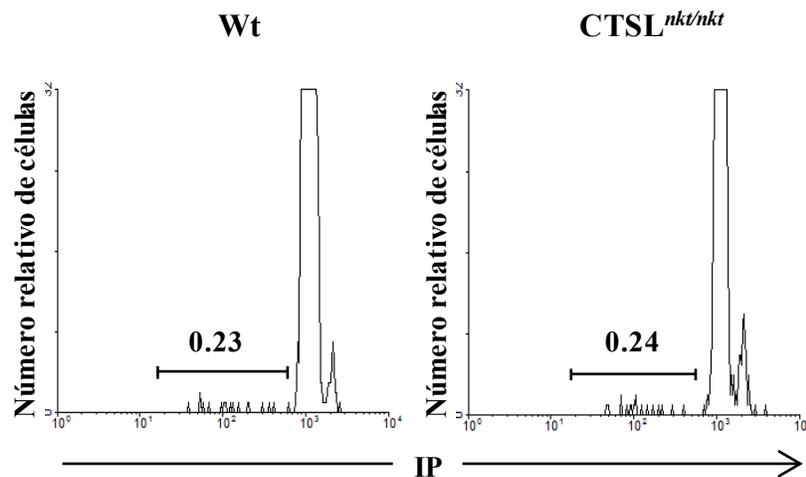


**Figura 7:** Histogramas representativos de los niveles de proliferación basales de la subpoblación de células B220<sup>+</sup> del bazo. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup> en proliferación. Los valores son representativos de tres experimentos independientes (n=4).

	% de proliferación basal de células B
Wt	1.40 ± 0.50
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	1.30 ± 0.70

**Tabla 3:** Niveles de proliferación basales de células B220<sup>+</sup> en el bazo de los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Células mononucleares de bazo fueron marcadas con IP y el anticuerpo anti-B220 FITC y analizadas por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Posteriormente investigamos si el incremento en los niveles de células B220<sup>+</sup> esplénicas de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> estaba asociado a alteraciones en sus niveles de apoptosis basales. Mediante marcación con IP y análisis por citometría de flujo determinamos el porcentaje de células B220<sup>+</sup> en apoptosis. No observamos ninguna alteración en la tasa de apoptosis basal de las células B del bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 8 y Tabla 4).



**Figura 8:** Histogramas representativos de los niveles de apoptosis basales de la subpoblación de células B220<sup>+</sup> del bazo. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup> en apoptosis. Los valores son representativos de tres experimentos independientes (n=4).

	% de apoptosis basal de células B
Wt	0.23 ± 0.01
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	0.24 ± 0.01

**Tabla 4:** Niveles de apoptosis basales de células B220<sup>+</sup> en el bazo de los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Células mononucleares de bazo fueron marcadas con el anticuerpo anti-B220 FITC y con IP y analizadas por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Estos resultados indican que el incremento en el número de células B en el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no está asociado con alteraciones en los niveles de proliferación o apoptosis basales de las mismas.

### 1.2.2- Caracterización de las subpoblaciones de células B del bazo

Las células B comienzan su maduración en la MO y aunque algunas de ellas completan su desarrollo en dicho órgano, la mayoría abandona la MO como células B inmaduras que migran a través de la sangre hacia el bazo donde completan su maduración<sup>89</sup>.

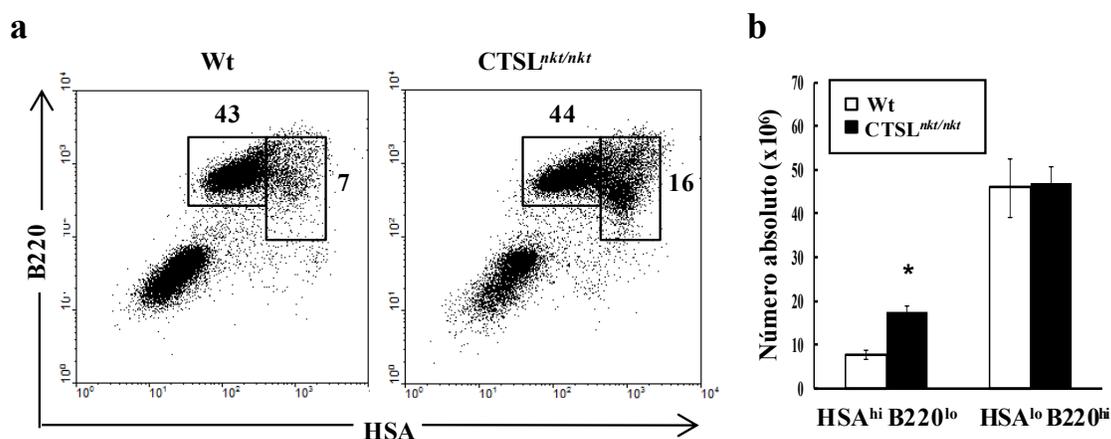
De acuerdo a varios criterios de funcionalidad y a características fenotípicas relacionadas a su grado de maduración, las células B del bazo se clasifican en células B transicionales y células B maduras<sup>90-94</sup>.

Las células B transicionales (o inmaduras) del bazo son aquellas células que han emigrado recientemente de la MO y comprenden a los estadios transicionales T1 y T2<sup>91</sup>. Por su parte, el compartimiento de células B maduras del bazo comprende a las células B FM y a las células B de la ZM<sup>90,91</sup>. Las células B T1 se diferencian a T2, las cuales maduran a células B FM o a células B de la ZM del bazo<sup>90</sup>.

Estas subpoblaciones pueden distinguirse de acuerdo a la expresión diferencial de distintos marcadores de superficie como las moléculas B220, HSA, CD21 y CD23<sup>91-93</sup>. Por ejemplo,

las células B transicionales expresan altos niveles de la molécula HSA y bajos niveles de B220 ( $HSA^{hi}B220^{lo}$ ) mientras que las células B maduras presentan bajos niveles de expresión de HSA y altos niveles de expresión de B220 ( $HSA^{lo}B220^{hi}$ )<sup>92,93</sup>.

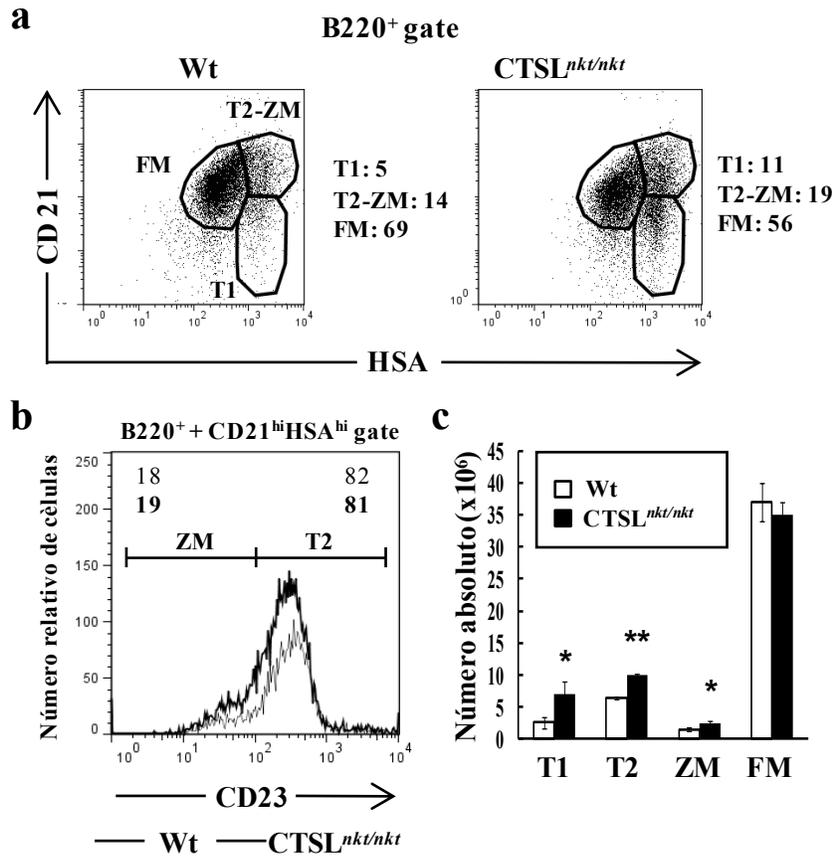
Investigamos entonces mediante FACS los niveles de células B transicionales y maduras en el bazo de los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$ . Encontramos que el porcentaje y número absoluto de células B transicionales ( $HSA^{hi}B220^{lo}$ ) del bazo se encuentra incrementado en los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$  (Figura 9a-b). En cambio, no observamos diferencias significativas en el porcentaje y número absoluto de células B maduras ( $HSA^{lo}B220^{hi}$ ) del bazo entre los ratones wt y los mutantes para CTSL (Figura 9a-b).



**Figura 9:** Niveles incrementados de células B transicionales en el bazo de los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$ . Células mononucleares de bazo de ratones wt y  $CTSL^{nkt/nkt}$  fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA, para su posterior análisis por citometría de flujo. (a) Dot plots representativos de células B transicionales ( $HSA^{hi}B220^{lo}$ ) y maduras ( $HSA^{lo}B220^{hi}$ ). Se indican los porcentajes correspondientes a cada estadio. (b) Números absolutos de células B transicionales ( $HSA^{hi}B220^{lo}$ ) y maduras ( $HSA^{lo}B220^{hi}$ ). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p < 0.0005$ . Se muestran resultados representativos de cuatro experimentos independientes.

La expresión diferencial de los marcadores de superficie HSA y CD21, permite distinguir tres grupos de células B del bazo: T1 (CD21<sup>lo</sup>HSA<sup>hi</sup>), T2+ZM (CD21<sup>hi</sup>HSA<sup>hi</sup>) y FM (CD21<sup>int</sup>HSA<sup>lo</sup>)<sup>91</sup>. Mediante FACS medimos los porcentajes correspondientes a cada grupo. Mientras que los porcentajes de células B T1 y T2+ZM resultaron significativamente incrementados en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, el porcentaje de células B FM resultó significativamente disminuido con respecto a los ratones wt (Figura 10a).

Mediante la expresión diferencial de la molécula CD23, es posible distinguir las células T2 (CD23<sup>+</sup>) de las de la ZM (CD23<sup>-</sup>) del bazo<sup>91</sup>. Con el objeto de investigar si tanto las células B T2 como las B de la ZM contribuían al incremento de las células CD21<sup>hi</sup>HSA<sup>hi</sup> en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, analizamos los niveles de expresión de la molécula CD23 dentro de este grupo. Observamos que las proporciones de las células B T2 y ZM fueron similares entre los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 10b). Estos resultados indican que tanto el porcentaje de células B T2 como el de las células B de la ZM del bazo se encuentran incrementados en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Con respecto a los números absolutos, observamos un incremento en el número de células B T1, T2 y ZM en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, mientras que no se observaron diferencias significativas en el número de células B FM respecto de los ratones wt (Figura 10c).



**Figura 10:** Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan niveles incrementados de células B transicionales y de la ZM del bazo. Células mononucleares de bazo de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-HSA, anti-CD21 y anti-CD23 y analizadas por citometría de flujo. (a) Dot plots representativos de células B del bazo T1 (CD21<sup>lo</sup>HSA<sup>hi</sup>), T2-ZM (CD21<sup>hi</sup>HSA<sup>hi</sup>) y FM (CD21<sup>int</sup>HSA<sup>lo</sup>). Se indican los porcentajes correspondientes a cada estadio dentro de la población de células B220<sup>+</sup>. (b) Histogramas representativos de los niveles de expresión de CD23 para distinguir las células T2 (CD23<sup>+</sup>) de las ZM (CD23<sup>-</sup>) dentro de la población de células B220<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>HSA<sup>hi</sup>. Los porcentajes correspondientes a las células T2 y ZM están indicados. (c) Números absolutos de células B T1, T2, ZM y FM. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). \**p*<0.05; \*\**p*<0.0005. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que el incremento en el número de células B esplénicas en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> resulta del incremento en el número de células B transicionales y de células B de la ZM.

### 1.2.3-Mecanismos involucrados en el aumento de células B transicionales del bazo en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>

Comenzamos analizando los niveles de proliferación basal de las células B transicionales del bazo mediante el marcado del ADN con 7-AAD<sup>347</sup>. Mediante análisis por FACS evaluamos el porcentaje de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) y maduras (HSA<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>) en proliferación. No observamos alteraciones en los niveles de proliferación basales de las células B transicionales o de las células B maduras de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Tabla 5).

	% de proliferación basal	
	Células B transicionales	Células B maduras
Wt	1.6 ± 0.5	0.18 ± 0.05
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	1.4 ± 0.4	0.14 ± 0.05

**Tabla 5:** Niveles de proliferación basales de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) y maduras (HSA<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>) en el bazo de los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Células mononucleares de bazo fueron marcadas con los anticuerpos anti-B220 y anti-HSA, permeabilizadas y marcadas con 7-AAD para su posterior análisis por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestra un experimento representativo de dos independientes con resultados similares.

Luego medimos el porcentaje de células B transicionales y maduras del bazo en apoptosis mediante marcación con anexina V. Los niveles de apoptosis de las células B transicionales y maduras de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> resultaron similares a los de las células de los ratones wt (Tabla 6).

	% de apoptosis basal	
	Células B transicionales	Células B maduras
Wt	25.3 ± 4.0	15.0 ± 3.0
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	29.7 ± 3.1	14.0 ± 1.0

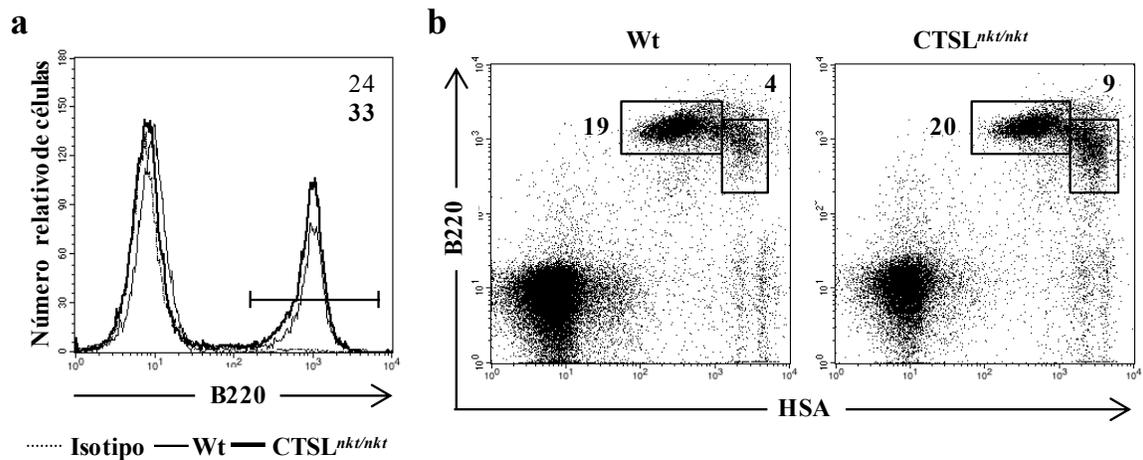
**Tabla 6:** Niveles de apoptosis basales de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) y maduras (HSA<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>) en el bazo de los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Células de bazo fueron marcadas con los anticuerpos anti-B220 y anti-HSA y con anexina V para su posterior análisis por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestra un experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Estos resultados indican que el incremento en el número de células B transicionales del bazo en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no está relacionado con alteraciones en los niveles de proliferación o apoptosis basales de las mismas.

### 1.3- Células B en la sangre periférica de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>

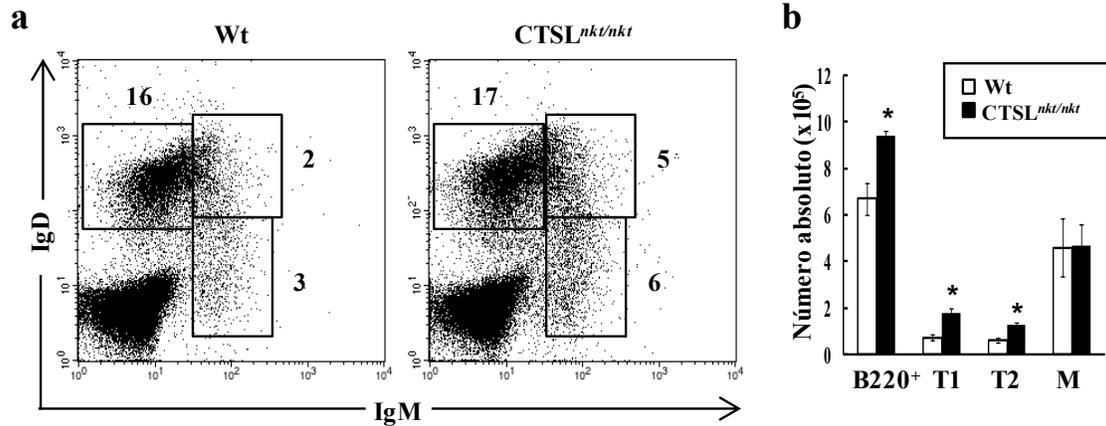
Teniendo en cuenta que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan un incremento en el número de células B transicionales del bazo, y que las mismas representan a las células que han emigrado recientemente de la MO, estudiamos si este incremento se veía reflejado también en la SP.

Mediante FACS observamos un aumento en el porcentaje y número de células B220<sup>+</sup> en la SP de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 11a). Este incremento estuvo restringido a las células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>), mientras que no se detectaron diferencias significativas en los valores correspondientes a las células B maduras (HSA<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>) (Figura 11b).



**Figura 11:** Niveles incrementados de células B en la SP de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Células mononucleares de SP de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA y analizadas por citometría de flujo. (a) Se muestran histogramas representativos de la expresión de B220. Los porcentajes de células B220<sup>+</sup> están indicados. (b) Dot plots representativos de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) y maduras (HSA<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>). Se indican los porcentajes correspondientes a cada estadio. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Además observamos que tanto el porcentaje como el número de células B T1 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>) y T2 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>) están significativamente incrementados en la SP de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, mientras que los valores de células B maduras (M=IgM<sup>lo</sup>IgD<sup>hi</sup>) no difieren significativamente entre ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 12, a-b).



**Figura 12:** Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan mayores niveles de células B transicionales en SP. Células mononucleares de SP de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-IgM y anti-IgD y analizadas por citometría de flujo. (a) Dot plots representativos de células B T1 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>), T2 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>), y M (IgM<sup>lo</sup>IgD<sup>hi</sup>) en SP. Se indican los porcentajes correspondientes a cada estadio (b) Números absolutos de células B totales (B220<sup>+</sup>), T1 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>), T2 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>), y M (IgM<sup>lo</sup>IgD<sup>hi</sup>) en SP. (d) Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p < 0.005$ . Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Por lo tanto, el número de células B transicionales tanto del bazo como de la SP se encuentra incrementado en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, mientras que el número de células B maduras se mantiene dentro de los valores normales.

Estos datos también sugieren que la emigración de las células B desde la MO hacia el bazo podría encontrarse incrementada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

## CAPÍTULO 1-CONCLUSIONES

- ◆ Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan un mayor porcentaje y número absoluto de células B en los órganos linfáticos periféricos.
- ◆ Tanto en los GL como en el bazo estos incrementos no están asociados con alteraciones en los niveles de proliferación y apoptosis basales de las células B220<sup>+</sup>.
- ◆ El incremento en el número de células B del bazo está restringido a las subpoblaciones de células B transicionales y de la ZM.
- ◆ Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan además mayores niveles de células B transicionales en SP.
- ◆ Teniendo en cuenta que las células B transicionales representan a las células que viajaron por sangre desde la MO hacia el bazo, y que las mismas están incrementadas tanto en la SP como en el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, estos datos sugieren que un mayor número de células B inmaduras provenientes de la MO llega al bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

## **CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA MADURACIÓN, PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN DE LINFOCITOS B DE LA MO EN LOS RATONES CTSL<sup>nkt/nkt</sup>**

La ontogenia B es un proceso muy regulado mediante el cual se generan linfocitos B funcionalmente activos a partir de las HSCs de la MO<sup>12,13</sup>. El desarrollo de los linfocitos B en la MO ocurre a través de estadios de maduración sucesivos que han sido definidos de acuerdo a la expresión diferencial de ciertos marcadores de superficie celular.

Una vez que las células B alcanzan el estadio de células B inmaduras, una pequeña proporción de las mismas continúa su desarrollo en la MO, mientras que la mayoría emigra hacia el bazo donde se diferencian a células B maduras. Estas células B maduras recirculan entre los distintos órganos linfáticos, entre ellos la MO.

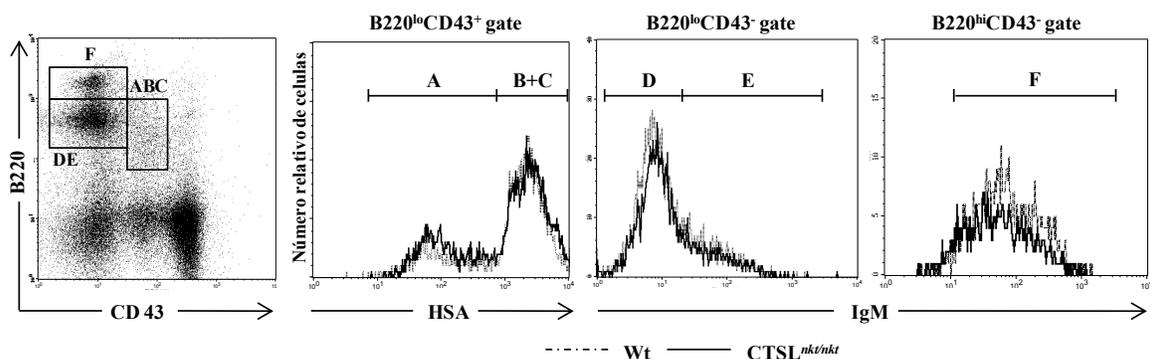
Por consiguiente, la MO alberga a los linfocitos B en sus diferentes etapas de desarrollo, desde los estadios de células más inmaduros hasta el estadio de células B maduras.

### **2.1- Maduración de los linfocitos B**

Investigamos entonces si la ausencia de actividad de CTSL afecta la maduración de las células B en la MO.

En primer lugar no detectamos alteraciones en la celularidad total de la MO de los ratones deficientes en CTSL (Tabla 8). Tampoco observamos diferencias significativas en el porcentaje y número absoluto de células B220<sup>+</sup> entre la MO de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Tablas 7-8).

Utilizando el criterio de clasificación de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup> (Introducción, pág 20-21), evaluamos mediante citometría de flujo la frecuencia y el número de las células B en sus distintos estadios de maduración. La MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no presentó modificaciones significativas en las proporciones y en los números absolutos de las células B en sus distintos estadios de diferenciación (Figura 13 y Tablas 7-8).



**Figura 13:** Estadios de maduración de las células B en la MO. Células de MO de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-CD43, anti-HSA o anti-IgM y analizadas por citometría de flujo. Los distintos estadios de diferenciación fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: Fracción A (células pre-pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>-/lo</sup>), Fracción B-C (células pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hi</sup>), Fracción D (células pre-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>), Fracción E (células B inmaduras: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) y Fracción F (células B maduras: B220<sup>hi</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>). Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

Porcentaje de células						
	Pre-pro-B (A)	Pro-B (B-C)	Pre-B (D)	Células B inmaduras (E)	Células B maduras (F)	Células B220 <sup>+</sup>
Wt	0.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	8.5 ± 1.2	4.0 ± 0.5	3.0 ± 0.4	23.3 ± 1.7
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	1.1 ± 0.1	3.1 ± 0.7	8.6 ± 1.4	4.1 ± 0.9	2.7 ± 0.2	22.9 ± 2.4

**Tabla 7:** Porcentaje de los linfocitos B en los distintos estadios de diferenciación en la MO. Células de MO de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-CD43, anti-HSA o anti-IgM y analizadas por citometría de flujo. Los distintos estadios de diferenciación fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: Fracción A (células pre-pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>-/lo</sup>), Fracción B-C (células pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hi</sup>), Fracción D (células pre-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>), Fracción E (células B inmaduras: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) y Fracción F (células B maduras: B220<sup>hi</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>). Se indica el porcentaje correspondiente a cada estadio y el de células B totales (B220<sup>+</sup>) con respecto al total de células de la MO. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

Número Absoluto (x10 <sup>5</sup> )							
	Pre-pro-B (A)	Pro-B (B-C)	Pre-B (D)	Células B inmaduras (E)	Células B maduras (F)	Células B220 <sup>+</sup>	Celularidad
Wt	3.9 ± 0.6	11.7 ± 0.6	35.4 ± 3.5	16.5 ± 2.3	10.5 ± 1.7	85.1 ± 8.5	416.3 ± 19.7
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	4.4 ± 0.3	13.0 ± 3.1	36.1 ± 5.5	17.3 ± 4.1	8.9 ± 1.1	86.2 ± 9.7	418.8 ± 16.5

**Tabla 8:** Números absolutos de las células B en sus distintos estadios de diferenciación en la MO. Células de MO de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-CD43, anti-HSA o anti-IgM y analizadas por citometría de flujo. Los distintos estadios de diferenciación fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: Fracción A (células pre-pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>-lo</sup>), Fracción B-C (células pro-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hi</sup>), Fracción D (células pre-B: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>), Fracción E (células B inmaduras: B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) y Fracción F (células B maduras: B220<sup>hi</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>). Los valores corresponden al promedio ± DS del número de células en cada fracción/fémur (n=4). Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

El hecho de que no se detectaron disminuciones ni aumentos en el número de células B en ninguno de sus estadios de desarrollo, sugiere que la secuencia madurativa de los linfocitos B en la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> ocurre de manera normal.

## 2.2- Producción de linfocitos B

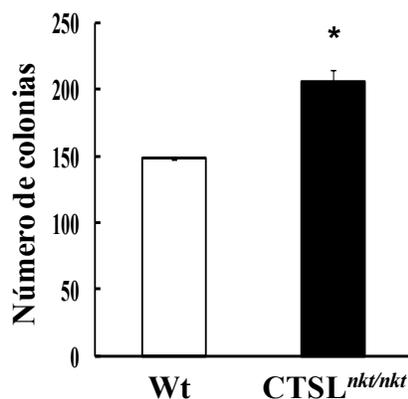
Teniendo en cuenta que la producción de linfocitos B es un determinante clave del tamaño del pool de las células B<sup>105</sup> y que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan un mayor número de células B periféricas, investigamos la producción de linfocitos B por la MO en los ratones deficientes para CTSL.

### 2.2.1- Experimentos *in vitro*: ensayos de UFC

Comenzamos investigando la producción de células B por la MO mediante ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC) pre-B. Para ello cultivamos células de MO en un medio semisólido suplementado con IL-7, el cual permite el crecimiento óptimo de los

precursores pre-B, que al proliferar forman colonias. De esta manera, es posible detectar y cuantificar los progenitores linfoides pre-B de la MO.

A los 7 días de cultivo, el recuento de colonias pre-B fue significativamente mayor en los cultivos de MO de ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> comparado con el de los provenientes de MO de ratones wt (Figura 14).



**Figura 14:** La MO de los ratones deficientes en CTSL presenta una mayor producción de linfocitos B *in vitro*. Células de MO provenientes de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron cultivadas en metilcelulosa suplementada con IL-7. A los 7 días de cultivo se enumeraron las colonias pre-B. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=3). \* $p < 0.001$ . Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Estos resultados indican que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presenta una mayor capacidad de producción de células B *in vitro*.

### 2.2.2- Experimentos *in vivo*: ensayos de autorreconstitución de MO

La homeostasis del sistema hematopoyético se debe en gran medida a la capacidad de las HSCs de diferenciarse, manteniendo la producción de células sanguíneas, y de autorrenovarse manteniendo de esta manera el pool de HSCs a lo largo de la vida. No

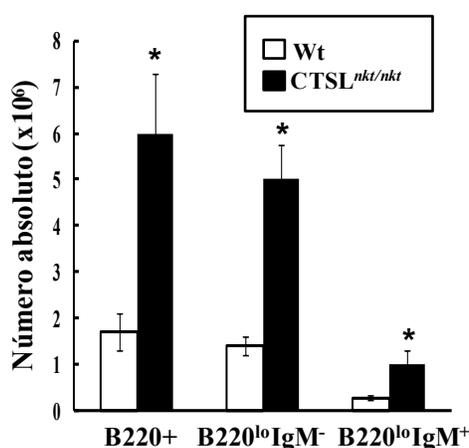
obstante, el proceso de autorrenovación de las HSCs no ocurre normalmente bajo condiciones homeostáticas, sino bajo condiciones de estrés. A pesar de tener un enorme potencial proliferativo y de repoblamiento, las HSCs son en su mayoría quiescentes (están en la fase G0 del ciclo celular) y se dividen muy infrecuentemente, mientras que muchos de los progenitores restringidos hacia un linaje particular se dividen rápidamente contribuyendo así al recambio diario de leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Sin embargo, en respuesta al estrés (por ejemplo la quimioterapia ablativa o irradiación) las HSCs progresan en el ciclo celular lo que permite una rápida repoblación de la MO con progenitores hematopoyéticos<sup>350</sup>.

Nuestros resultados *in vitro* sugirieron que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presenta una mayor capacidad de producción de células B. Con el objetivo de confirmar estos resultados *in vivo* realizamos ensayos de autorreconstitución de MO<sup>351</sup>. Para ello, ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron irradiados con una dosis de radiación subletal (500 rad) de manera de eliminar a los linfocitos maduros e inmaduros presentes. Las HSCs son resistentes a este nivel de irradiación lo cual permite la reconstitución del sistema hematopoyético<sup>349</sup>.

Estos ensayos han sido bien caracterizados en cuanto a la cinética de desarrollo de las células B luego de la irradiación. Hasta el día 12 post-irradiación no es posible detectar células B en el bazo. Luego al día 13 post-irradiación se observa un predominio de células B transicionales en el bazo, mientras que las células B maduras recién pueden ser detectadas a partir del día 17 de la irradiación<sup>351</sup>.

Teniendo en cuenta que en el estado estacionario el número absoluto de precursores de células B de la MO no difiere entre los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, evaluamos la producción de células B en momentos tempranos post-irradiación, antes de que se alcance un estado de equilibrio en la MO. Dado que las células B transicionales representan la producción reciente de la MO y que predominan en momentos tempranos post-irradiación, evaluamos mediante FACS el desarrollo de las células B 13 días después de la irradiación cuando la mayoría de las células B del bazo son transicionales (>98% HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>)<sup>349,351,352</sup>.

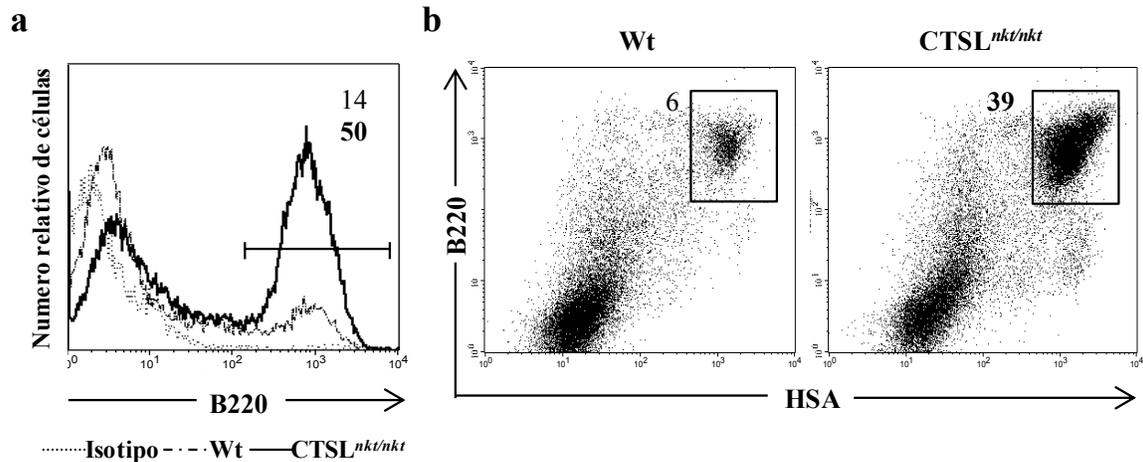
No observamos diferencias en los porcentajes de las células B en los distintos estadios de maduración de la MO entre ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (datos no mostrados). Sin embargo, la celularidad total de la MO en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fue 3 veces mayor con respecto a la de los ratones wt y el número absoluto de células B en los distintos estadios de desarrollo resultó significativamente incrementado en estos ratones (Figura 15).



**Figura 15:** Desarrollo de las células B luego de una ablación parcial de la MO. Células de MO de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> irradiados subletalmente 13 días antes, fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-IgM y analizadas por FACS. Se muestran los números absolutos de los precursores de células B y de células B totales (B220<sup>+</sup>) en la MO. Los precursores de células B fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> (Fracciones A-D) y B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> (Fracción E). Los valores corresponden al promedio ± DS (n=9). \**p*<0.005. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

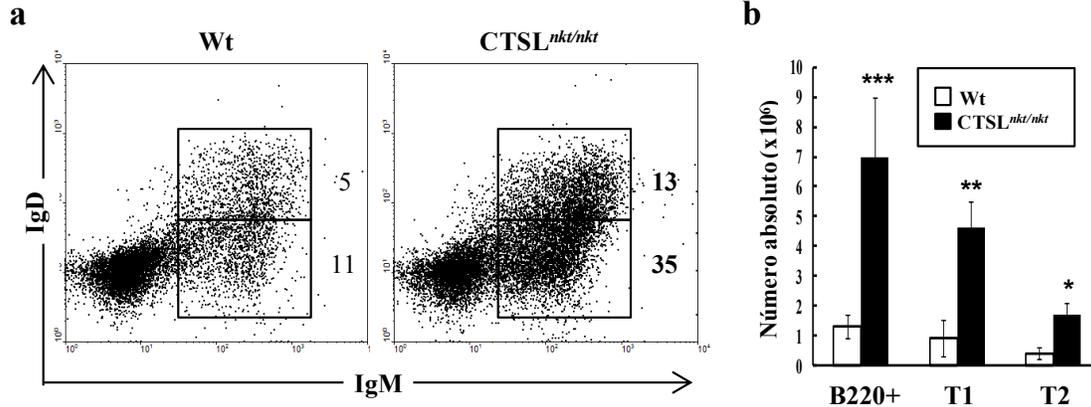
Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentaron además un incremento significativo en la celularidad total del bazo (2 veces mayor) y en el porcentaje de células B220<sup>+</sup> esplénicas con respecto a los ratones wt (Figura 16a). En concordancia con resultados reportados por otros autores<sup>349,351,352</sup>, tanto en los ratones wt como en los CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, más del 98% de las células B220<sup>+</sup> del bazo mostraron un fenotipo transicional (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>), mientras que no se detectaron células B maduras (HSA<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>) (Figura 16b). El porcentaje de células B

transicionales del bazo de los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$  fue 6 veces mayor al de los ratones wt (Figura 16b).



**Figura 16:** Los ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$  presentan una mayor linfopoyesis B *in vivo*. Ratones wt y  $CTSL^{nkt/nkt}$  fueron irradiados subletalmente. 13 días después células mononucleares de bazo fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA, y luego analizadas por FACS. (a) Histogramas representativos de células B del bazo. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup>. (b) Dot plots representativos de células B transicionales ( $HSA^{hi}B220^{lo}$ ) del bazo. Los porcentajes de células  $HSA^{hi}B220^{lo}$  están indicados. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

El incremento en las células B transicionales incluyó un mayor porcentaje y número absoluto de células correspondientes a ambos estadios transicionales T1 ( $IgM^{hi}IgD^{low}$ ) y T2 ( $IgM^{hi}IgD^{hi}$ ) (Figura 17a-b).



**Figura 17:** Incremento de la linfopoyesis B en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron irradiados subletalmente. 13 días después, células mononucleares de bazo fueron marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-IgD y anti-IgM y analizadas por FACS. (a) Dot plots representativos de células B transicionales T1 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>) y T2 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>) del bazo. Se indican los porcentajes correspondientes a cada estadio. (b) Números absolutos de células B totales (B220<sup>+</sup>), T1 y T2 del bazo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=9). \* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.0005; \*\*\* $p$ <0.0001. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

En conjunto estos resultados indican que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> es capaz de sostener una mayor linfopoyesis B *in vivo*.

### 2.3- Exportación de linfocitos B

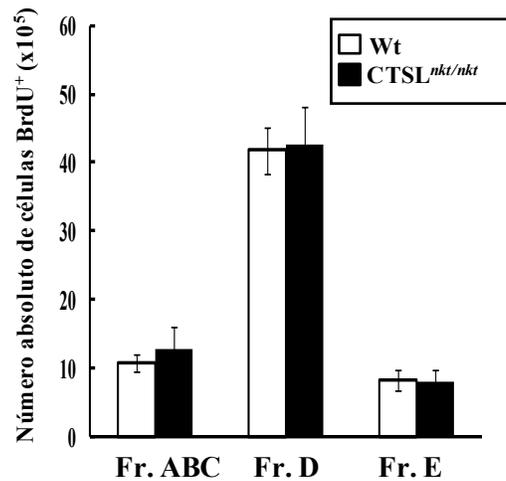
Nuestros resultados muestran que aunque la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no presenta alteraciones en el número absoluto de precursores de células B, es capaz de sostener una mayor producción de linfocitos B. Además, como explicáramos previamente, el incremento en el número de células B transicionales del bazo (que representan a las células que han emigrado recientemente de la MO) no estaría asociado a alteraciones en sus niveles de proliferación ni de apoptosis basales. Estos datos apoyan la hipótesis de que la emigración de células B desde la MO hacia el bazo podría estar incrementada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

Teniendo en cuenta que las células pro y pre-B de la MO proliferan activamente<sup>28</sup> mientras que la mayoría de las células B transicionales y maduras del bazo son quiescentes<sup>93,94</sup> (ver resultados capítulo 1.2), realizamos un pulso con BrdU de manera de marcar las células pro y pre-B en proliferación y poder seguir así su desarrollo<sup>89</sup>. Mediante esta técnica, al segundo día de la marcación pueden identificarse en el bazo células B con marca positiva para BrdU. Estas células representan a los precursores de las células B de la MO que incorporaron BrdU y emigraron hacia el bazo<sup>353</sup>.

En primer lugar analizamos el porcentaje y número de precursores de células B de la MO con marca positiva para BrdU. Como puede observarse en la Tabla 9 y en la Figura 18, no se observaron diferencias significativas en estos parámetros entre ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, indicando que la tasa de proliferación basal de los precursores de las células B de la MO no difiere entre los ratones wt y mutantes.

Porcentaje de células BrdU <sup>+</sup>			
	Fracciones ABC	Fracción D	Fracción E
Wt	72.0 ± 6.7	86.8 ± 7.1	56.0 ± 5.9
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	72.3 ± 5.1	84.1 ± 6.7	52.3 ± 4.7

**Tabla 9:** Los precursores de células B de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no presentan alteraciones en la proliferación. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron inoculados con BrdU por 2 días. Luego células de MO fueron extraídas y marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-CD43 y anti-IgM para su posterior análisis por FACS. Los estadios de células B fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: Fracciones ABC (B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>) y FracciónD (B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>) y Fracción E (B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup>). Se indica el porcentaje de células positivas para BrdU dentro de cada estadio madurativo. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=4). Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.



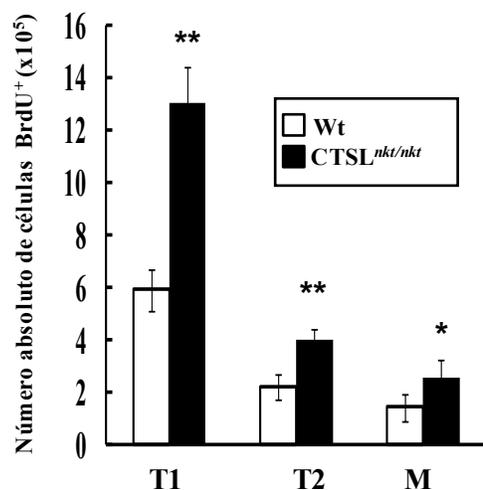
**Figura 18:** La MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no presenta diferencias en el número de precursores de células B en proliferación. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron inoculados con BrdU por 2 días. Luego células de MO fueron extraídas y marcadas con anticuerpos anti-B220, anti-CD43, y anti-IgM para su posterior análisis por FACS. Los estadios de células B fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: Fracciones ABC (B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>) y Fracción D (B220<sup>lo</sup>CD43<sup>-</sup>) y Fracción E (B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup>). Se indican los números absolutos de los precursores de células B de la MO marcados con BrdU. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

En cuanto al bazo, observamos un incremento en el porcentaje y número absoluto de células marcadas con BrdU dentro de las subpoblaciones de células B transicionales T1 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>) y T2 (IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>) y de las células maduras M (IgM<sup>low</sup>IgD<sup>hi</sup>) en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Tabla 10 y Figura 19).

Porcentaje de células BrdU <sup>+</sup>			
	T1	T2	M
Wt	7.51 $\pm$ 0.70	1.72 $\pm$ 0.23	0.29 $\pm$ 0.06
CTSL <sup>nkt/nkt</sup>	11.33 $\pm$ 0.57**	2.81 $\pm$ 0.17**	0.49 $\pm$ 0.01*

**Tabla 10:** Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan una mayor emigración de células B desde la MO hacia el bazo. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron inoculados con BrdU por 2 días. Luego células mononucleares de bazo fueron

marcadas con anticuerpos anti-IgD y anti-IgM para su posterior análisis por FACS. Se indican los porcentajes de células marcadas con BrdU correspondientes a las células B transicionales T1 ( $IgM^{hi}IgD^{low}$ ), T2 ( $IgM^{hi}IgD^{hi}$ ) y maduras M ( $IgM^{low}IgD^{hi}$ ). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ . Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 19:** La MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> exporta un mayor número de células B al bazo. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron inoculados con BrdU por 2 días. Luego células mononucleares de bazo fueron marcadas con anticuerpos anti-IgD y anti-IgM para su posterior análisis por FACS. Se indican los números absolutos de células B transicionales T1 ( $IgM^{hi}IgD^{low}$ ), T2 ( $IgM^{hi}IgD^{hi}$ ) y maduras M ( $IgM^{low}IgD^{hi}$ ) marcadas con BrdU. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ . Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

Estos resultados indican que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan una mayor emigración de células B inmaduras desde la MO hacia el bazo.

## CAPÍTULO 2-CONCLUSIONES

- ◆ No se observaron alteraciones en la frecuencia o en el número absoluto de los linfocitos B en sus distintas etapas de desarrollo en la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Estos resultados indican que la MO de los ratones deficientes en CTSL no presenta bloqueos en la maduración de las células B que conduzcan a una acumulación o disminución en el número de células B en algún estadio de desarrollo en particular.
- ◆ Mediante ensayos de UFC, observamos que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presenta una mayor capacidad de producción de linfocitos B *in vitro* con respecto a la MO de los ratones wt.
- ◆ Experimentos de irradiación y autorreconstitución demostraron que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> es capaz de sostener una mayor linfopoyesis B *in vivo*.
- ◆ Experimentos de emigración de células B de la MO realizados mediante un pulso con BrdU, indicaron que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> exporta un mayor número de células B inmaduras al bazo.
- ◆ El incremento en la producción y en la exportación de células B inmaduras de la MO contribuirían al incremento en el número de células B transicionales del bazo en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.
- ◆ En conjunto estos resultados indican que la producción y la salida de las células B de la MO hacia la periferia estaría aumentada en los ratones deficientes para CTSL. Estos resultados sugieren además que la maduración de las células B en la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> estaría acelerada.

### **CAPÍTULO 3. ROL DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS Y DEL MICROAMBIENTE DE LA MO EN EL INCREMENTO DE LA LINFOPOYESIS B EN LOS RATONES CTSL<sup>nkt/nkt</sup>**

El compartimento celular de la MO comprende a una población heterogénea de células, incluyendo a las células hematopoyéticas en sus diferentes etapas de la diferenciación y a las CE. Las CE producen diversos factores reguladores positivos y negativos de la hematopoyesis, así como los distintos componentes de la ECM y moléculas de adhesión que contribuyen a la formación de nichos específicos para las distintas poblaciones de células hematopoyéticas. Estos nichos regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas<sup>170-177</sup>.

La frecuencia de las CE en la MO es muy baja (15.000 células por fémur, ó 0,125% de la celularidad de la médula). Por lo tanto, es muy difícil estudiar la función de CE aisladas. Sin embargo, a través de cultivos de CE de MO es posible reproducir al menos algunas características del microambiente de la médula y poder evaluar así la influencia de las CE en la hematopoyesis<sup>193</sup>.

A lo largo de este capítulo se detallan los resultados de distintos ensayos que permiten evaluar si el efecto de la mutación *nkt* sobre la linfopoyesis B, deriva de la ausencia de actividad de CTSL en las CE y/o en los progenitores de células hematopoyéticas.

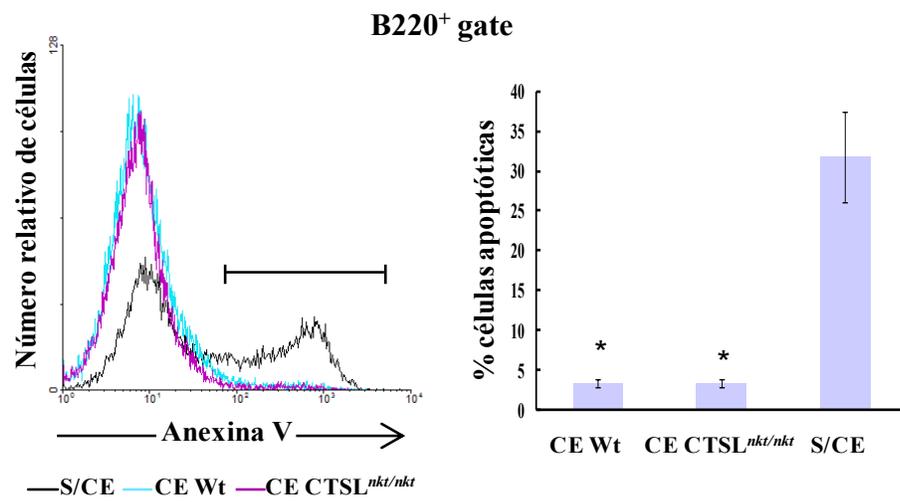
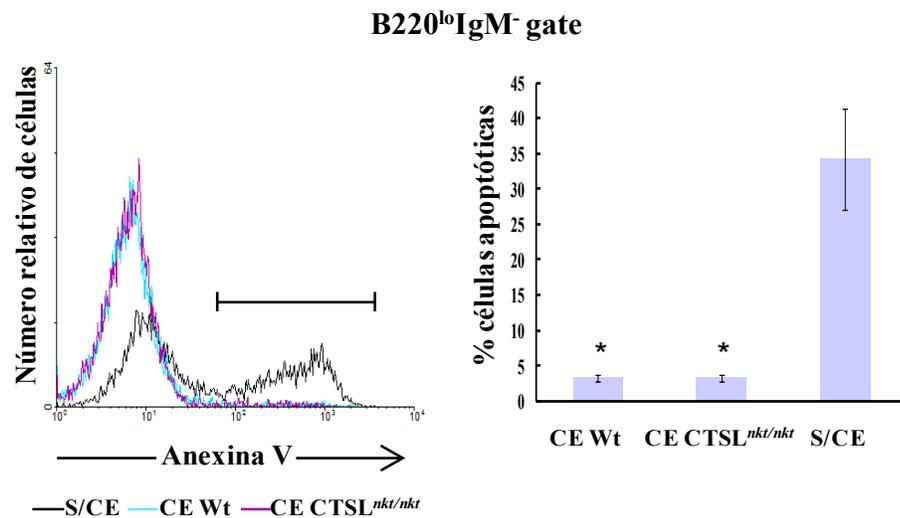
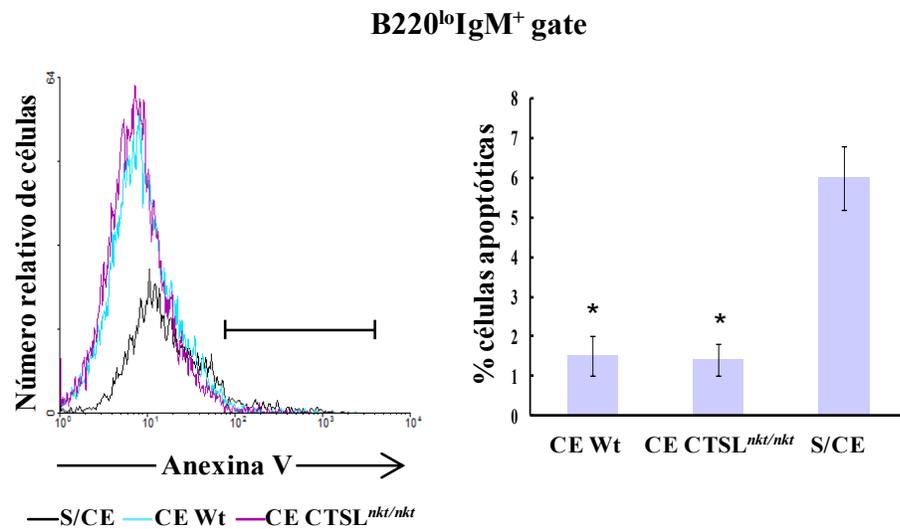
#### **3.1-Influencia de las CE de la MO en la supervivencia de las células B**

Con el propósito de investigar si la ausencia de actividad de CTSL en las CE influencia la viabilidad de los linfocitos B, realizamos co-cultivos entre células no adherentes de MO y monocapas de CE de MO wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup> por 48hs. Luego mediante marcación con anexina V y análisis por FACS determinamos los niveles de apoptosis en los precursores de células B de la MO. En forma paralela y como control, cultivamos células no adherentes de MO en ausencia de CE.

Como puede observarse en la figura 20a, la presencia de CE disminuyó notablemente la apoptosis de las células B220<sup>+</sup>. Este efecto fue observado además para las subpoblaciones de células B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> (Figura 20b) y B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> (Figura 20c).

En concordancia con resultados previamente reportados por Hardy R.R. y col.<sup>71</sup> en los cuales se demuestra que el contacto con las CE es fundamental para la supervivencia de los estadios de células B más inmaduros y que en cambio, la supervivencia de los estadios de células B más maduros resulta más independiente del contacto celular, observamos que la supervivencia de la subpoblación de células B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> dependió fuertemente de la presencia de CE (Figura 20b), mientras que la supervivencia de las células B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> resultó menos afectada por la ausencia de CE (Figura 20c). Estos resultados indican que la presencia de las CE posee un efecto diferencial sobre la apoptosis entre ambas subpoblaciones.

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en el rescate de la apoptosis mediado por las CE wt o deficientes para CTSL.

**a****b****c**

**Figura 20:** Influencia del estroma de la MO en la supervivencia de los precursores de células B. Células de MO de ratones wt fueron cultivadas por 24hs. Luego las células no adherentes fueron cosechadas y cultivadas sobre monocapas de CE de MO wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup> por 48hs. El porcentaje de células apoptóticas se determinó por marcación con anexina V y análisis por FACS (a-c). Histogramas representativos de los niveles de apoptosis en las subpoblaciones de células B220<sup>+</sup> (a), B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> (b) y B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> (c). Se indican los porcentajes de células positivas para anexina V dentro de las células B220<sup>+</sup> (a), B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> (b) y B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> (c). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=4). \* $p < 0.0001$  con respecto al control (sin CE= S/CE). Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.

Estos resultados indican que las CE disminuyen considerablemente los niveles de apoptosis de las células B *in vitro*.

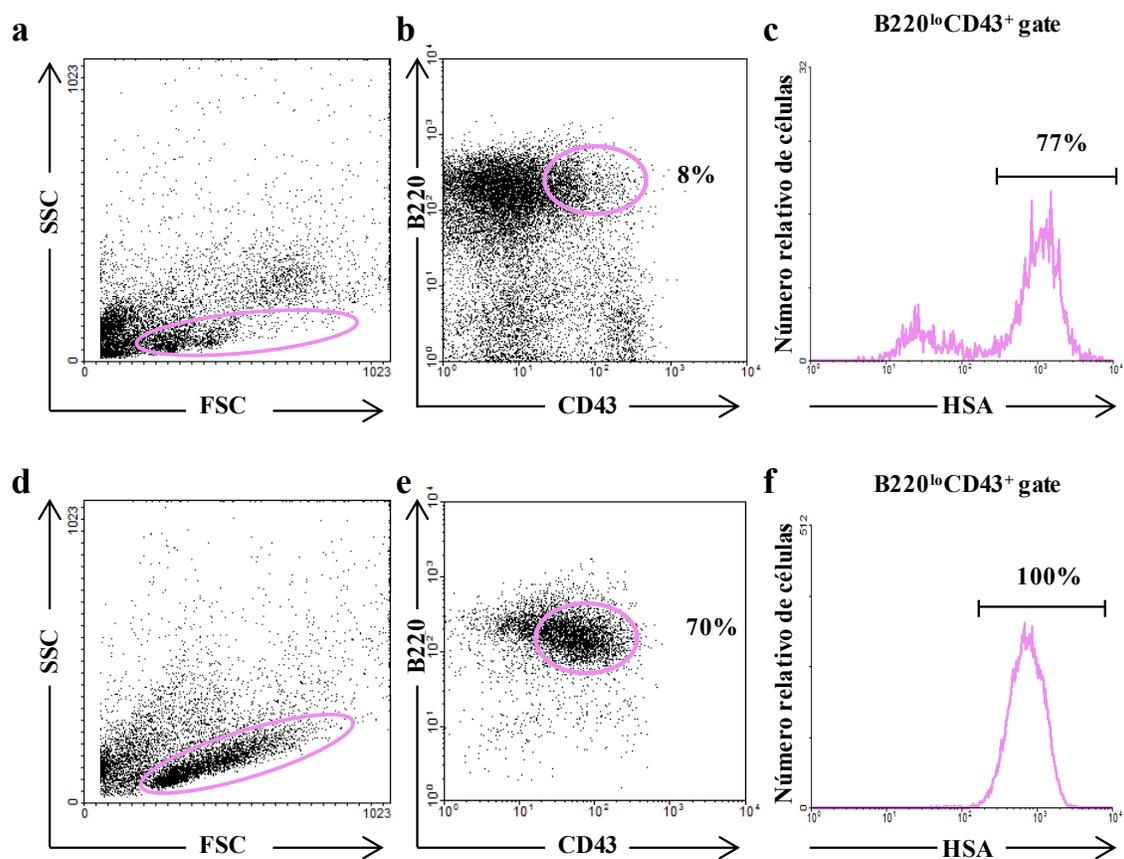
El hecho de que no se observaron diferencias en el rescate de la apoptosis mediado por las CE wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, indicó que la ausencia de actividad de CTSL en las CE no produce alteraciones en los niveles de apoptosis de los progenitores de células B *in vitro*.

### 3.2.- Experimentos *in vitro*: ensayos de UFC sobre cultivos de CE

Con el objeto de estudiar la contribución del microambiente de la MO y la de los precursores de células B en la mayor producción de células B observada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, desarrollamos ensayos de UFC en presencia de cultivos primarios de estroma de MO.

En primer lugar realizamos ensayos de UFC luego del co-cultivo entre células no adherentes de MO y monocapas de CE de MO wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Observamos que el número de colonias pre-B luego del co-cultivo entre células no adherentes de MO wt y CE CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fue significativamente mayor con respecto al derivado del co-cultivo con estroma wt (datos no mostrados). Sin embargo, debido a que los números de colonias obtenidos fueron muy bajos, independientemente de la concentración de células no adherentes ensayada, decidimos utilizar la metodología descrita por Tsuboi I y col.<sup>348</sup>, que consiste en obtener una suspensión celular de MO enriquecida en células pro-B y luego evaluar la influencia del estroma sobre esta subpoblación. Brevemente, suspensiones

celulares de MO de ratones wt y  $CTSL^{nkt/nkt}$  fueron enriquecidas en células pro-B ( $>70\%$ :  $B220^{lo}CD43^{+}HSA^{hi}$ ) por cultivo en presencia de concentraciones saturantes de IL-7 (Figura 20). Las suspensiones celulares enriquecidas en células pro-B fueron co-cultivadas con CE de MO de ratones wt o  $CTSL^{nkt/nkt}$  en presencia de IL-7 durante 3 días. Las células no adherentes fueron cosechadas, contadas y utilizadas para realizar el ensayo de UFC sobre metilcelulosa suplementada con IL-7. Siete días más tarde, se enumeraron las colonias de más de 30 células<sup>348</sup>.



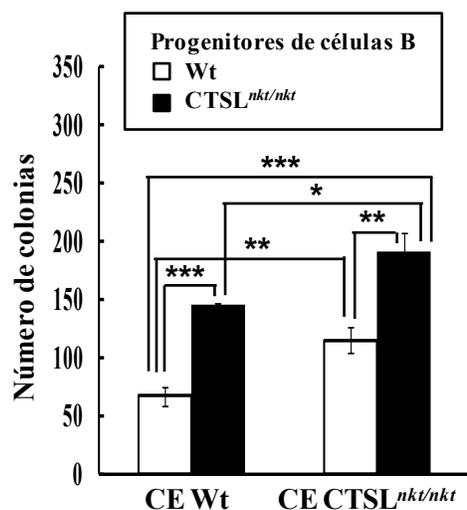
**Figura 20:** Enriquecimiento de células pro-B por cultivo en presencia de IL-7. Células de MO de ratones  $CTSL^{nkt/nkt}$  y wt fueron cultivadas en ausencia (a-c) o presencia (d-f) de IL-7 por 4 días. (a y d) Dot plots representativos del tamaño (FSC) versus la complejidad (SSC) celular. (b y e) Dot plots representativos de la expresión de B220 y CD43. Se indica el porcentaje de células  $B220^{lo}CD43^{+}$ . (c y f) Histogramas

representativos de la expresión de HSA. Se indica el porcentaje de células HSA<sup>hi</sup> dentro de la subpoblación de células B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en la figura 21, luego del co-cultivo de los precursores de células B wt con estroma wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, se registró un mayor número de colonias pre-B en presencia de estroma CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, indicando que la mutación *nkt* expresada por las CE de la MO contribuye al incremento en la producción de células B en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Por otro lado, en presencia de estroma wt los precursores de células B CTSL<sup>nkt/nkt</sup> dieron origen a un mayor número de colonias pre-B con respecto a los precursores de células B wt, indicando que la presencia de la mutación *nkt* en los precursores de células B es capaz de afectar la linfopoyesis B.

Es interesante señalar que el co-cultivo entre los precursores de células B CTSL<sup>nkt/nkt</sup> y el estroma CTSL<sup>nkt/nkt</sup> produjo el mayor número de colonias pre-B, sugiriendo que los efectos de la mutación *nkt* en las CE y en los precursores de células B son aditivos.

Estos resultados indican que tanto los precursores de las células B como el microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, están involucrados en el incremento de la linfopoyesis B.



**Figura 21:** La ausencia de actividad de CTSL en los precursores de células B y en las CE de MO incrementa la producción de linfocitos B *in vitro*. Células de MO de ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron cultivadas con IL-7 por 4 días para obtener una población celular enriquecida en células pro-B (B220<sup>lo</sup>CD43<sup>+</sup>HSA<sup>hi</sup>). Las células pro-B fueron cultivadas sobre monocapas de CE de MO wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup> en presencia de IL-7 por 3 días. Las células no adherentes fueron cosechadas, contadas y utilizadas para realizar el ensayo de UFC. 7 días más tarde se enumeraron las colonias de más de 30 células. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=3). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.005, \*\*\* $p$ <0.001. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

### 3.3- Experimentos *in vivo*: trasplantes de MO

Mediante experimentos de trasplante de MO recíprocos investigamos la influencia de la mutación *nkt* en los progenitores hematopoyéticos y en las CE sobre la linfopoyesis B *in vivo*.

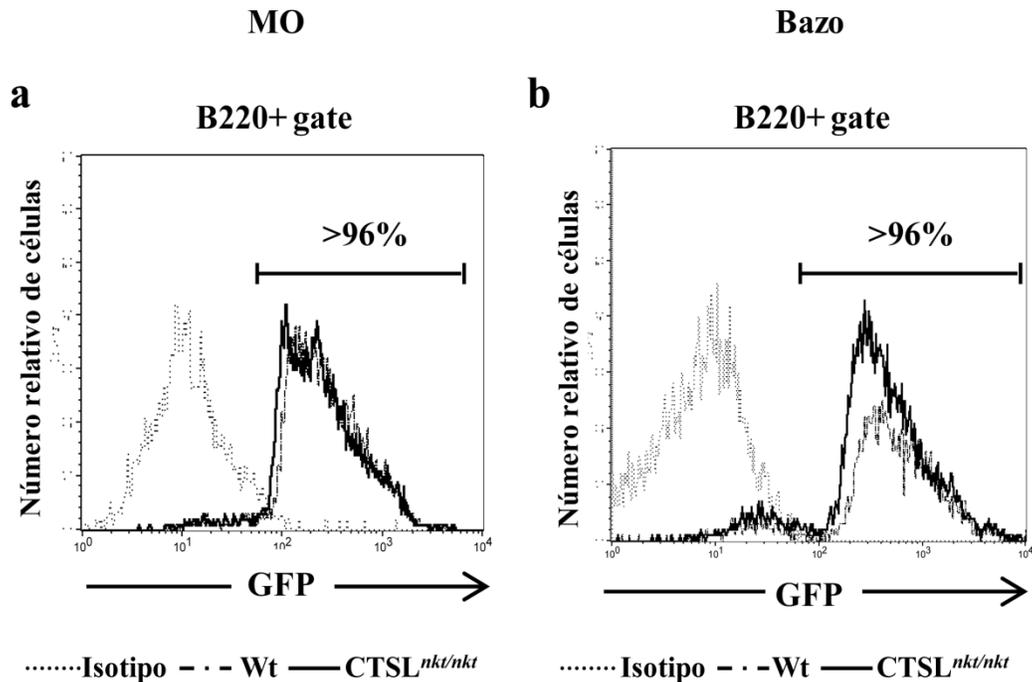
### 3.3.1- Efecto de la ausencia de actividad de CTSL en el microambiente de la MO sobre la producción de los linfocitos B

Con el objeto de confirmar *in vivo* la influencia del microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> en la mayor producción de linfocitos B, desarrollamos quimeras de MO. Para ello, ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> y wt fueron irradiados con una dosis de radiación letal (900 rad) y 24 hs más tarde inoculados por vía endovenosa con células de MO provenientes de ratones wt. En experimentos desarrollados paralelamente, células de MO de ratones BALB/c-GFP fueron inoculadas en ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> irradiados letalmente, de manera de determinar además el porcentaje de células dadoras (células GFP+) involucradas en la recomposición de las células B en los ratones huéspedes.

Estudios de quimeras de MO realizados por Allman y col.<sup>93</sup> han demostrado que las células B pueden ser detectadas recién a partir del día 12 post-trasplante. En este punto, es posible detectar precursores de células B en la MO, mientras que las células B maduras recién pueden ser detectadas a partir del día 18 post-trasplante. Además, a los 12 días del trasplante la mayoría de las células B del bazo son transicionales (>98% HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>), mientras que la presencia de células B maduras en el bazo se observa a partir del día 15.

Con el objeto de evaluar la producción temprana de células B por la MO, antes de que se alcance el estado estacionario, evaluamos mediante FACS el desarrollo de las células B a los días del 12 del trasplante, momento en el que predominan las células B transicionales (>98% HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) en el bazo<sup>93</sup>.

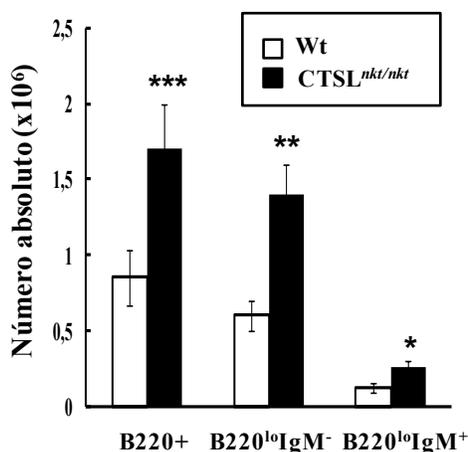
En primer lugar observamos que en los ratones trasplantados con células de MO de ratones BALB/c-GFP, tanto en la MO como en el bazo, más del 96% de las células B220<sup>+</sup> fueron positivas para GFP (Figura 22). Estos resultados indican que tanto en los huéspedes wt como en los CTSL<sup>nkt/nkt</sup> el pool de linfocitos B fue reconstituido principalmente a partir de las células dadoras provenientes de los ratones BALB/c-GFP (Figura 22).



**Figura 22:** Los ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron reconstituidos principalmente con células dadoras provenientes de ratones BALB/c-GFP. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> irradiados con una dosis de radiación letal, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones BALB/c-GFP. A los 12 días, células de MO y bazo fueron marcadas con el anticuerpo anti-B220 y luego analizadas por FACS. (a y b) Histogramas representativos de la expresión de GFP. Se indica el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> dentro de la población de células B220<sup>+</sup> de la MO (a) o del bazo (b). Como control negativo de la expresión de GFP (isotipo) se utilizaron células de MO (a) o de bazo (b) de ratones wt. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

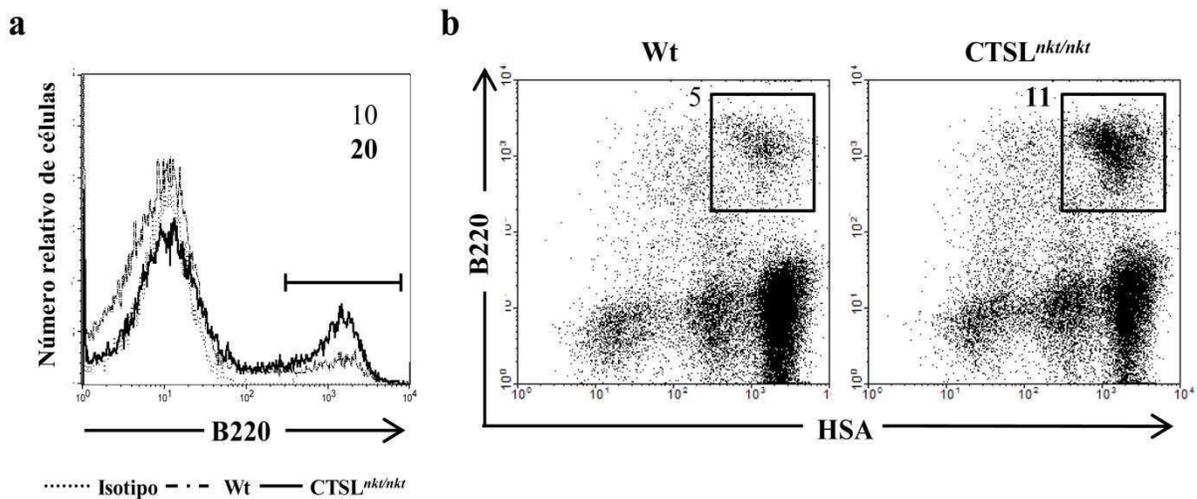
No observamos diferencias significativas en la frecuencia de las células B en los distintos estadios de maduración de la MO entre huéspedes wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (datos no mostrados). No obstante, registramos un incremento significativo en la celularidad total de la MO de los huéspedes CTSL<sup>nkt/nkt</sup> con respecto a los huéspedes wt (2 veces mayor) y en el número absoluto de células B (Figura 23). Este incremento incluyó a todos los estadios de maduración de los linfocitos B de la MO, con excepción de las células B maduras ya que al día del análisis aún no se encuentran presentes<sup>93</sup>.

Se obtuvieron resultados similares tanto en los experimentos donde se utilizaron células dadoras de ratones wt como en los que se utilizaron células dadoras de ratones BALB/c-GFP.

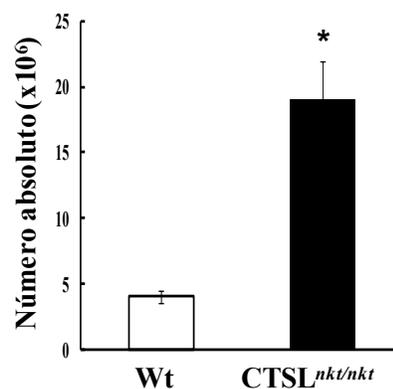


**Figura 23:** El microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> influye en el número de precursores de células B. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> irradiados letalmente, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones wt. A los 12 días, células de MO de los huéspedes wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-IgM y luego analizadas por FACS. Se muestran los números absolutos de los precursores de células B y de células B totales (B220<sup>+</sup>) en la MO. Los precursores de células B fueron clasificados según la nomenclatura de Hardy R.R. y col.<sup>71</sup>: B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> (Fracciones A-D) y B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> (Fracción E). Los valores corresponden al promedio ± DS (n=10). \**p*<0.05; \*\**p*<0.005; \*\*\**p*<0.0005. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

En cuanto al bazo, observamos un incremento significativo en la celularidad total (2 veces mayor) y en el porcentaje de células B220<sup>+</sup> en los huéspedes CTSL<sup>nkt/nkt</sup> con respecto a los huéspedes wt (Figura 24a). En concordancia con los resultados reportados por Allman y col.<sup>93</sup> más del 98% de las células B220<sup>+</sup> del bazo mostraron un fenotipo transicional (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>)(Figura 24b). Los huéspedes CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mostraron un incremento significativo tanto en el porcentaje (Figura 24b) como en el número absoluto de células B transicionales del bazo (Figura 25).



**Figura 24:** El microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> favorece la linfopoyesis B. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> irradiados con una dosis de radiación letal, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones wt. A los 12 días, células mononucleares de bazo de los huéspedes wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA y luego analizadas por FACS. (a) Histogramas representativos de células B del bazo. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup>. (b) Dot plots representativos de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) del bazo. Los porcentajes de células HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup> están indicados. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.



**Figura 25:** Influencia del microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> en la producción de linfocitos B. Ratones wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> irradiados con una dosis de radiación letal, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones wt. A los 12 días, células de bazo de los huéspedes wt y CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA y luego analizadas por FACS. Se indican los números absolutos de células

B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) del bazo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=10). \* $p < 0.001$ . Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que, *in vivo*, el microentorno de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> está involucrado en el incremento de la producción de linfocitos B y en el incremento del número de células B transicionales del bazo en estos ratones.

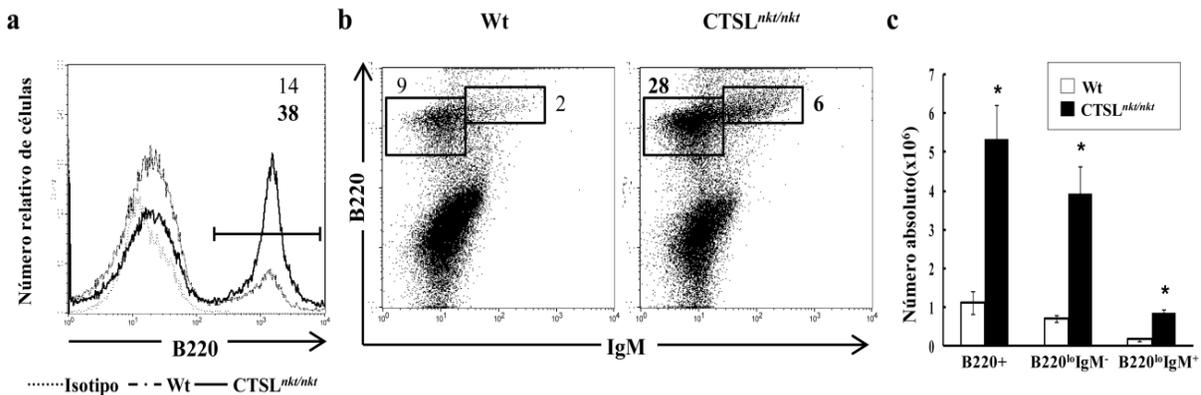
### **3.3.2- Efecto de la mutación *nkt* en los progenitores de células hematopoyéticas de la MO sobre la linfopoyesis B**

Con el objeto de investigar la contribución de los precursores hematopoyéticos de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> en la mayor producción de células B *in vivo*, huéspedes wt irradiados letalmente (900 rad) fueron trasplantados 24 hs más tarde con células de MO provenientes de ratones wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

A los 12 días del trasplante, las células de la MO y del bazo fueron analizadas por FACS de manera de evaluar el desarrollo de los linfocitos B en dichos órganos<sup>93</sup>.

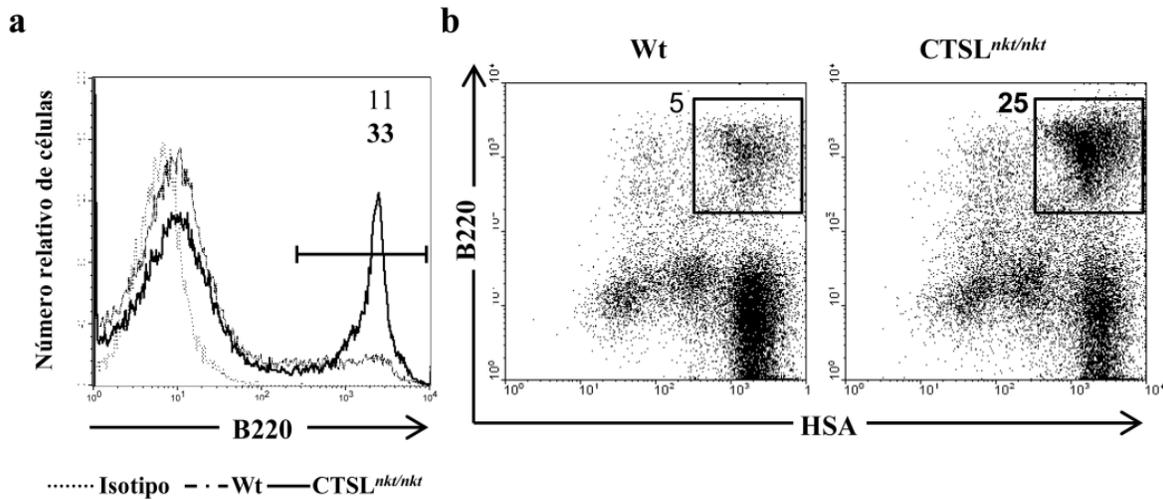
En primer lugar registramos un incremento significativo (2 veces mayor) en la celularidad total de la MO en los ratones trasplantados con células de MO de ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> con respecto a los huéspedes trasplantados con células de MO wt.

Tanto el porcentaje como el número absoluto de células B de la MO fueron mayores en los ratones trasplantados con células de MO de ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 26a y c). Este incremento se observó en todos los estadios de maduración de los linfocitos B de la MO (Figura 26 b-c).

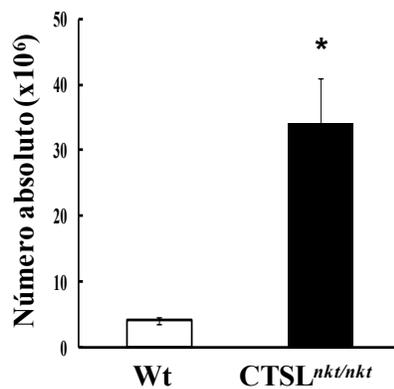


**Figura 26:** La ausencia de actividad de CTSL en los precursores de células hematopoyéticas incrementa la linfopoyesis B. Ratones wt irradiados con una dosis de radiación letal, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. A los 12 días, células de MO de los huéspedes wt fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-IgM y luego analizadas por FACS. (a) Histogramas representativos de células B de MO. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup>. (b) Dot plots representativos de los precursores de células B en la MO. Se indican los porcentajes de células B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup> (Fracciones A-D) y B220<sup>lo</sup>IgM<sup>+</sup> (Fracción E)<sup>71</sup>. (c) Números absolutos de los precursores de células B y de células B totales (B220<sup>+</sup>) en la MO. Los valores corresponden al promedio ± DS (n=10). \**p*<0.0005. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Además observamos un incremento significativo en la celularidad total (2 veces mayor) y en el porcentaje de células B220<sup>+</sup> del bazo en los ratones trasplantados con células de MO de ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> (Figura 27a). Los ratones trasplantados con células de MO CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mostraron un incremento significativo tanto en el porcentaje (Figura 27b) como en el número absoluto de células B transicionales del bazo (Figura 28).



**Figura 27:** Los precursores hematopoyéticos de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> contribuyen al incremento de la linfopoyesis B. Ratones wt irradiados con una dosis de radiación letal, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. A los 12 días, células de bazo de los huéspedes wt fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA y luego analizadas por FACS. (a) Histogramas representativos de células B del bazo. Se indican los porcentajes de células B220<sup>+</sup>. (b) Dot plots representativos de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) del bazo. Los porcentajes de células HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup> están indicados. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.



**Figura 28:** Influencia de los progenitores hematopoyéticos de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> en la producción de linfocitos B. Ratones wt irradiados con una dosis de radiación letal, recibieron 24 hs más tarde un trasplante de MO de ratones wt o CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. A los 12 días, células de bazo de los huéspedes wt fueron marcadas con anticuerpos anti-B220 y anti-HSA y luego analizadas por FACS. Se indican los números

absolutos de células B transicionales (HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>) del bazo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  DS (n=10). \* $p$ <0.0005. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes.

Estos resultados confirman que los progenitores de células hematopoyéticas de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> contribuyen en el incremento de la linfopoyesis B *in vivo* así como al aumento en el número de células B transicionales del bazo en estos ratones.

### CAPÍTULO 3-CONCLUSIONES

- ◆ Las CE de la MO disminuyeron notablemente los niveles de apoptosis de los precursores de células B *in vitro*, especialmente los de la subpoblación de células B220<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup>. Sin embargo, no observamos un efecto diferencial sobre la apoptosis de los precursores de células B debido a la ausencia de actividad de CTSL en las CE.
  
- ◆ Mediante ensayos de UFC en presencia de estroma de MO evaluamos el efecto de la mutación *nkt* en las CE y en los precursores de células B sobre la producción de linfocitos B *in vitro*. Nuestros resultados indican que tanto los precursores de las células B como las CE de la MO de los ratones CTSL<sup>*nkt/nkt*</sup> contribuyen al incremento de la linfopoyesis B *in vitro*.
  
- ◆ Los resultados obtenidos a partir de experimentos de trasplante de MO recíprocos indican que la presencia de la mutación *nkt* tanto en las CE como en los precursores de las células hematopoyéticas favorece la producción de linfocitos B *in vivo* así como el incremento en el número de células B transicionales registrado en el bazo de los ratones CTSL<sup>*nkt/nkt*</sup>.

# Discusión

La funcionalidad y efectividad del sistema inmune dependen del mantenimiento de un conjunto estable de diferentes subpoblaciones celulares que desempeñan roles específicos durante las respuestas inmunes. Así, tanto el número absoluto de cada subpoblación celular como su frecuencia relativa deben ser finamente regulados de manera de asegurar el desarrollo normal de una respuesta inmune eficaz. Alteraciones en este equilibrio pueden conducir a distintas patologías como inmunodeficiencias, síndromes linfoproliferativos y autoinmunes<sup>354</sup>.

La proteasa lisosomal CTSL ejerce una amplia influencia sobre el sistema inmune. Estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> demostraron que la falta de actividad de la CTSL genera alteraciones tempranas en la selección positiva de los timocitos CD4<sup>+</sup><sup>317</sup>. Se demostró además que la CTSL regula el nivel de expresión de diversos componentes de la ECM en los órganos linfoides e influencia el número y la composición de las poblaciones linfoides T centrales y periféricas<sup>317,343</sup>.

Durante el desarrollo de esta Tesis investigamos la participación de la CTSL en la regulación del número de células B tanto en la MO como en la periferia.

En primer lugar investigamos si la mutación *nkt* estaba asociada a alteraciones en las poblaciones de células B periféricas. Observamos que los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> muestran un mayor porcentaje y número absoluto de células B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>. Aunque no puede descartarse que otras poblaciones celulares que expresan la molécula B220 -como las células NK o las CDs plasmocitoides- también estén aumentadas, el incremento en el número de células que coexpresan B220 y CD19 (marcador ausente en las células NK) así como el de células CD19<sup>+</sup> que coexpresan IgM o IgD (que no son expresadas por las células NK ni por las CDs plasmocitoides) confirma el incremento en el número de las células B en los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

El hecho de que las células B de los GL muestran niveles de expresión normales de B220, CD19, IgM e IgD, indica que las células B de los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan un fenotipo maduro.

Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que las células B de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> proliferan en respuesta al mitógeno LPS y secretan anticuerpos IgG específicos frente a OVA, indicando que las células B de los ratones mutantes para CTSL son funcionales<sup>355</sup>.

El número de linfocitos B resultó incrementado en el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, aunque la magnitud de dicho incremento fue menor al registrado en los GL. Desarrollamos un análisis más exhaustivo de modo de evaluar si el aumento en el número de células B en el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> abarcaba a las distintas subpoblaciones de células B.

**Los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentaron un mayor porcentaje y número absoluto de células B transicionales T1 y T2 y de células B de la ZM del bazo. Por el contrario, el número de células B FM resultó normal.**

Considerando que las células B inmaduras viajan desde la MO hacia el bazo por sangre, medimos los niveles de las mismas en SP. Observamos un incremento en el número de células B inmaduras o transicionales en la SP de los ratones deficientes en CTSL. Por su parte, el número de células B maduras en la SP de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no mostró diferencias significativas respecto del de los ratones wt.

**Por lo tanto, de la misma manera que ocurre en el bazo, la SP de los ratones deficientes en CTSL presenta un mayor número de células B transicionales.**

La homeostasis de las poblaciones linfoides periféricas depende por un lado, de la producción permanente de estas células por los órganos linfoides centrales y por el otro, de los niveles de proliferación y apoptosis de las mismas en la periferia.

Estudiamos en primer lugar si la ausencia de actividad de CTSL era capaz de alterar los niveles de proliferación y apoptosis basales de las células B de los GL y del bazo. Las tasas de proliferación y de apoptosis basales de las células B de los GL de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no difirieron significativamente de las observadas en los ratones wt.

**Estos resultados indican que el incremento en el número de células B en los GL de los ratones mutantes para CTSL no está asociado a la presencia de alteraciones en sus niveles de proliferación o apoptosis basales.**

Tampoco se observaron diferencias significativas en los índices de proliferación o de apoptosis de las células B esplénicas entre los ratones mutantes y los wt. Más aún, la subpoblación de células B transicionales -cuyo número está aumentado en el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>- no mostró alteraciones en sus niveles de proliferación y apoptosis basales.

**El hecho de que los índices de proliferación y apoptosis basales de las células B transicionales esplénicas no difieren significativamente entre ratones wt y mutantes, indica que el incremento en el número de células B transicionales del bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no está relacionado con alteraciones en los niveles de dichos procesos.**

Como explicáramos en la Introducción, las células B se originan en la MO y emigran como células B inmaduras hacia el bazo dónde completan su maduración. En este órgano, las células B transicionales atraviesan procesos de selección positiva y negativa y la mayoría de las células B T2 sobrevivientes se diferencia a células B FM, mientras que una minoría se diferencia a células B de la ZM<sup>90</sup>. Resultados anteriores de nuestro laboratorio demostraron que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presentan adenomegalia, siendo el número absoluto de células linfoides por GL tres veces mayor al registrado en los GL de los ratones wt<sup>343</sup>. Además, los GL de los ratones deficientes en CTSL presentan una mayor expresión de diversos componentes de la ECM como colágenos, laminina y fibronectina<sup>343</sup>. En cambio el bazo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presenta una celularidad normal y no muestra alteraciones en los niveles de expresión de los componentes de la ECM<sup>343</sup>. Teniendo en cuenta que la ECM regula la disponibilidad y actividad de diversos factores de crecimiento, quemoquinas y hormonas que regulan la supervivencia de las células B, puede proponerse que el incremento en los niveles de componentes de la ECM en los GL podría dar lugar a un aumento en la disponibilidad de nichos linfoides, lo que permitiría el soporte de un mayor número de células B. Dado que las células B FM recirculan desde el bazo hacia otros órganos

linfáticos como los GL, un mayor número de linfocitos B FM provenientes del bazo podría entrar y permanecer en el microambiente alterado de los GL de los ratones mutantes. Por otro lado, las células B de la ZM que, a diferencia de las células B FM no recirculan sino que permanecen en el bazo, muestran un número significativamente aumentado en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

Por otra parte, el hecho de que las células B transicionales del bazo representan a las células que han emigrado recientemente de la MO<sup>92,93</sup> y que el número de las mismas se encuentra incrementado en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> -en ausencia de alteraciones en su tasa de proliferación y/o apoptosis- nos sugirió que la emigración de las células B desde la MO hacia el bazo podría estar incrementada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

La tasa de producción de los linfocitos B es un determinante clave del tamaño del pool de células B<sup>105</sup>. Por lo tanto, los factores que regulan la tasa de producción son elementos claves en el mantenimiento de la homeostasis de las células B periféricas. Investigamos entonces si la ausencia de actividad de CTSL era capaz de afectar la linfopoyesis B.

En primer lugar, no observamos alteraciones en la frecuencia o en el número absoluto de las células B en sus distintos estadios de maduración en la MO de los ratones mutantes para CTSL. **El hecho de que la maduración de las células B en la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no presenta bloqueos en ninguno de los estadios de desarrollo, sugiere que el pasaje de un estadio de diferenciación a otro no requeriría de la presencia de CTSL funcional.**

Con el objeto de investigar si la ausencia de actividad de CTSL era capaz de afectar la producción de células B por la MO, realizamos en primer lugar ensayos de UFC.

**Los resultados obtenidos indicaron que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> presenta una mayor capacidad de producción de células B *in vitro*.**

Investigamos entonces si la ausencia de CTSL afectaba la linfopoyesis B *in vivo* mediante ensayos de irradiación y autorreconstitución de MO. Dado que en condiciones homeostáticas los ratones mutantes no muestran aumentos en las poblaciones de precursores de células B de la MO, evaluamos la producción temprana de células B por la MO antes de que se alcanzara el estado estacionario. Dado que las células B transicionales representan la producción reciente de la MO y que predominan en etapas tempranas post-irradiación, evaluamos los niveles de recomposición de células B en la MO y en el bazo al día 13 post-irradiación, cuando la mayoría de las células B en el bazo son transicionales (>98% HSA<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>)<sup>349,351,352</sup>. Observamos que el número de precursores de células B en la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fue 2 veces mayor al registrado en la MO de los ratones wt. Además el número de células B transicionales del bazo fue 7 veces mayor en los ratones deficientes para CTSL.

**Estos resultados demuestran que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> es capaz de sostener una mayor linfopoyesis B *in vivo*.**

En conjunto nuestros resultados indican que, a pesar de que en condiciones homeostáticas no se observa un aumento en el número de precursores de células B en la MO, la producción de linfocitos B y el número de células B transicionales en la SP y el bazo se encuentran incrementados en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Basándonos en que las células B transicionales representan a las células B en desarrollo que emigran desde la MO hacia el bazo, estos datos nos sugirieron que la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> podría estar exportando una mayor cantidad de células B al bazo. Teniendo en cuenta que los precursores de las células B de la MO presentan una alta tasa proliferativa<sup>28,89</sup>, mientras que las células B del bazo son en su mayoría quiescentes<sup>93,94</sup>, realizamos un pulso con BrdU. Dos días después de la inoculación de BrdU, se pueden detectar en el bazo células B marcadas que representan a los precursores de las células B de la MO que incorporaron BrdU y emigraron hacia el bazo<sup>353</sup>. De esta manera, al marcar a los precursores de células B de la MO en proliferación es posible cuantificar su afluencia al bazo como células B transicionales<sup>353</sup>.

Los precursores de células B de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no mostraron diferencias significativas en su tasa de proliferación comparada con la de los ratones wt. Sin embargo, el número de células B esplénicas marcadas con BrdU fue 2 veces mayor en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> con respecto a los wt, observándose el mayor incremento en la subpoblación de células B T1.

**Estos resultados indican que los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> exportan un número aumentado de células B desde la MO hacia el bazo.**

**El conjunto de estos resultados indica que la producción y salida de las células B de la MO hacia la periferia está aumentada en estos mutantes y sugiere que la maduración de los linfocitos B en la MO estaría acelerada.**

El desarrollo de los linfocitos B depende del microentorno de la MO, formado por las CE y la ECM que éstas secretan. Las CE además de brindar el soporte necesario para el desarrollo de los linfocitos B, actúan como una fuente de factores de crecimiento críticos que regulan su diferenciación<sup>170-177</sup>. Por su parte, la ECM regula la disponibilidad, actividad y localización de los factores de crecimiento y genera señales involucradas en la diferenciación y proliferación de los progenitores de células B<sup>170,182,183</sup>.

Por otra parte, alteraciones intrínsecas de los precursores de células B pueden modificar la capacidad de producción de linfocitos B por la MO<sup>356-358</sup>.

Con el objeto de evaluar si el efecto de la mutación *nkt* sobre la linfopoyesis B estaba mediado por la falta de CTSL en las CE y/o en los progenitores de células B, realizamos ensayos de UFC en presencia de estroma de MO derivado de ratones wt y mutantes. Observamos que la presencia de CE CTSL<sup>nkt/nkt</sup> incrementa el número de colonias pre-B a comparación con el estroma wt, indicando que la falta de actividad de CTSL en las CE de la MO contribuye al incremento de la linfopoyesis B. La presencia de CE CTSL<sup>nkt/nkt</sup> fue capaz de incrementar el número de colonias tanto cuando se utilizaron precursores de células B wt como cuando se utilizaron precursores de células B CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

Por otro lado, los precursores de células B CTSL<sup>nkt/nkt</sup> dieron origen a un mayor número de colonias pre-B con respecto a los precursores de células B wt, independientemente del origen del estroma. Por lo tanto la ausencia de actividad de CTSL en los precursores de células B también participaría en la mayor producción de linfocitos B por la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

El hecho de que el mayor número de colonias se obtuvo luego del co-cultivo entre los precursores de células B CTSL<sup>nkt/nkt</sup> y el estroma CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, sugiere que los efectos causados por la ausencia de actividad de CTSL en los precursores de células B y en el estroma de la MO sobre la linfopoyesis B son aditivos.

**Estos resultados indican que la presencia de la mutación *nkt* tanto en los precursores de las células B como en las CE de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, juega un rol en el incremento de la linfopoyesis B *in vitro*.**

Con el objeto de investigar *in vivo* la influencia de la mutación *nkt* en los precursores hematopoyéticos y en el microambiente de la MO sobre el incremento de la linfopoyesis B en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>, desarrollamos experimentos de trasplante de MO recíprocos.

De la misma manera que en los experimentos de autorreconstitución, evaluamos la recomposición temprana de las células B en la MO y en el bazo, antes de que se alcanzara el estado estacionario.

Cuando se comparó el nivel de recomposición de células B en la MO entre huéspedes CTSL<sup>nkt/nkt</sup> y wt trasplantados con células de MO wt, se observó un mayor número de precursores de células B en la MO de los huéspedes mutantes. Correlativamente, el número de células B transicionales del bazo fue significativamente mayor en los huéspedes CTSL<sup>nkt/nkt</sup>. Estos resultados indican que el microambiente de la MO de los ratones deficientes en CTSL es capaz de sostener una mayor linfopoyesis B *in vivo*.

Para determinar la influencia de la mutación *nkt* en los precursores de células B, se compararon los niveles de recomposición de células B en la MO y en el bazo de huéspedes wt trasplantados con células de MO CTSL<sup>nkt/nkt</sup> o wt. Tanto el porcentaje como el número absoluto de precursores de células B de la MO fueron mayores en los ratones trasplantados con células de MO CTSL<sup>nkt/nkt</sup> que en los trasplantados con células de MO wt. Además el

bazo de los huéspedes wt trasplantados con células de MO CTSL<sup>nkt/nkt</sup> mostró un mayor número de células B transicionales que el bazo de los huéspedes trasplantados con células de MO wt. Estos resultados indican que los progenitores de células hematopoyéticas de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> contribuyen al incremento de la linfopoyesis B *in vivo*.

**En conjunto, los resultados de los trasplantes de MO recíprocos indican que tanto los precursores hematopoyéticos como el microambiente de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> están involucrados en la mayor producción de linfocitos B *in vivo*.**

El esquema que surge a partir del conjunto de estos experimentos puede delinarse de la siguiente manera: la MO de los ratones mutantes produce un mayor número de linfocitos B. La presencia de la mutación *nkt* tanto en los precursores de los linfocitos B como en el microentorno de la MO determinaría un aumento en la capacidad de producción de células B por la MO de los ratones carentes de actividad de CTSL. Sin embargo, como el número de precursores de linfocitos B no está aumentado en la MO de los mutantes mientras que el número de células B que se exporta a la periferia está significativamente incrementado, puede postularse que la velocidad de maduración (es decir, el tiempo en que tardan las células B en pasar de un estadio de desarrollo al siguiente y alcanzar el estadio de célula B inmadura) estaría acelerada.

El hecho de que, estando aumentada la producción de células B, no se observen incrementos en el número de células B en ninguno de los estadios de desarrollo, permite hipotetizar además que el incremento en la producción de linfocitos B podría estar asociado a aumentos en los precursores linfoides más tempranos como los CLPs.

Además, aunque hemos demostrado que la producción de las células T CD4<sup>+</sup> por el timo de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> está disminuida debido a un defecto en la selección positiva temprana<sup>317</sup>, la producción y exportación de timocitos CD8<sup>+</sup> está muy aumentada, lo que apoyaría la hipótesis de un incremento en la linfopoyesis asociada a aumentos en el número de CLPs.

En los ratones mutantes, las células B transicionales se acumulan en el bazo (ya que su número está aumentado en ausencia de alteraciones en los niveles de proliferación y

apoptosis). Este resultado abre la posibilidad de que la velocidad de maduración de las células B en este órgano no esté alterada.

Además, teniendo en cuenta que los niveles de proliferación y apoptosis de las células B son normales tanto en el bazo como en los GL y que el número de células B FM esplénicas es normal mientras que el número de linfocitos B FM en los GL está incrementado, puede postularse que un mayor número de linfocitos B FM sale del bazo a la circulación y al alcanzar los GL se establecen en ellos. En este sentido cabe reiterar que -a diferencia del bazo- el estroma de los GL de estos mutantes presenta un conspicuo aumento de diversos componentes de la ECM, lo que podría estar asociado a su capacidad para albergar un número aumentado de linfocitos B (y T).

**En conclusión, nuestros datos demuestran que la CTSL juega un rol en el mantenimiento de la homeostasis de las poblaciones B, participando en la regulación de la producción y la salida de las células B de la MO y en la determinación del número de linfocitos B en los GL y en el bazo.**

Los mecanismos moleculares involucrados en el aumento de la producción de las células B por la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> no han sido aún dilucidados. Hasta la fecha, la actividad de la CTSL sobre factores involucrados en la linfopoyesis B ha sido estudiada en diversos tejidos y órganos pero, en nuestro conocimiento, no existen datos acerca de la actividad de esta proteasa sobre diferentes sustratos en la MO. Analizaremos entonces los efectos que podrían derivar de la ausencia de actividad de CTSL sobre diversas moléculas blanco de esta proteasa que poseen efectos demostrados sobre la hematopoyesis B, bajo la hipótesis de que la actividad de la CTSL en las CE o en los precursores de células B de la MO podría también estar implicada en la proteólisis de dichas moléculas.

El factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), cuyo efecto positivo sobre la hematopoyesis B ha sido documentado<sup>359-360</sup>, forma complejos con sus proteínas de binding (IGFBPs). La proteólisis de las IGFBPs es el mecanismo principal que permite la liberación de IGF-1 de dichos complejos<sup>361</sup>. Utilizando fibroblastos deficientes en CTSL que

presentan una disminución en la degradación de IGFBP3<sup>362</sup>, se ha demostrado que la CTSL juega un rol en la liberación del IGF-1. Una disminución en la degradación de IGFBP3 por falta de actividad de CTSL conduciría a menores niveles de IGF-1 disponibles. Aún si se demostrara que la CTSL en las CE de la MO es responsable de la degradación de la IGFBP3 en éste tejido, la consecuente disminución en los niveles de IGF-1 disponibles determinada por la falta de actividad de CTSL derivaría eventualmente en un efecto negativo sobre la linfopoyesis B, lo que no apoya la hipótesis de la participación de la CTSL en la degradación de los complejos IGF-1/IGFBPs como el mecanismo implicado en el aumento de la linfopoyesis B en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

Por otro lado, en un modelo experimental de infarto de miocardio, se ha demostrado una disminución en los niveles de expresión de los factores SCF y SDF1 en el miocardio de ratones KO para CTSL<sup>363</sup>. Dado que ambos factores son reguladores positivos de la linfopoyesis B<sup>210,231</sup>, una disminución de SCF y SDF1 que derivara de la ausencia de actividad de CTSL en el estroma de la MO daría como resultado una disminución en la hematopoyesis B; por lo tanto, una posible actividad de la CTSL sobre estos factores en la MO no parecería estar implicada en el efecto positivo sobre la linfopoyesis B observada en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup>.

Se ha reportado que las CE de la MO establecen sitios de hematopoyesis activa conocidos como “nichos” hematopoyéticos donde residen las HSCs<sup>170-177</sup>. La capacidad de las HSCs de autorrenovarse y diferenciarse es fundamental para la homeostasis de la hematopoyesis, por lo tanto, los nichos hematopoyéticos deben ser capaces de regular finamente estos procesos especialmente luego de una mielosupresión. Los osteoblastos forman nichos para las HSCs que están en un estado quiescente, mientras que las células endoteliales de la MO establecen nichos para las HSCs que están en un estado más activado (ciclando). El rol de las células endoteliales queda claramente expuesto en situaciones de estrés, como por ejemplo el derivado de la quimioterapia o irradiación. En este contexto se propone que mientras el nicho osteoblástico modula la quiescencia de las HSCs, el nicho endotelial regenera y repuebla la población de HSCs luego de una mieloablación<sup>364</sup>.

Se ha reportado además que la activación selectiva de Akt en las células endoteliales de la MO aumenta la expresión de factores angiocrinos específicos que promueven la autorrenovación y expansión de las HSCs, mientras que la activación conjunta de Akt y MAPK favorece el mantenimiento y la diferenciación de estas células<sup>364</sup>. Recientemente se ha demostrado que la CTSL es capaz de bloquear la señalización de Akt en los cardiomiocitos<sup>307</sup>. Además, se ha reportado que en keratinocitos deficientes en CTSL se produce una mayor activación de las vías de señalización Akt y MAPK<sup>365</sup>.

Los mutantes para CTSL mostraron una recuperación hematopoyética más eficiente después de una irradiación subletal. Teniendo en cuenta que luego de una mieloablación las HSCs progresan en el ciclo celular y que las células endoteliales de la MO actúan como nichos para estas células, podría hipotetizarse que una mayor activación de Akt en las células endoteliales de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> podría aumentar el número de HSCs acelerando de esta manera la autorreconstitución hematopoyética luego de la irradiación en estos ratones.

Además, la interacción de las HSCs con las células endoteliales juega un rol crítico en el mantenimiento de la hematopoyesis en el estado estacionario<sup>364</sup>; por lo tanto no puede descartarse que en condiciones homeostáticas una mayor activación de Akt en las células endoteliales de la MO de los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> de cómo resultado un incremento en la autorrenovación y expansión de las HSCs influenciando de esta manera la producción de linfocitos B.

Por otra parte, diversos estudios sobre el eje Akt en los linfocitos B, han permitido establecer la importancia de esta vía sobre los procesos de diferenciación, proliferación, recombinación de segmentos VDJ y cambio de isotipo de los linfocitos B<sup>366</sup>. Por lo tanto, no puede descartarse que una mayor activación de esta vía de señalización en los precursores de células B en los ratones CTSL<sup>nkt/nkt</sup> esté implicada en el incremento de la hematopoyesis B en estos ratones.

**A pesar de que en los últimos años se han descrito diversas funciones específicas de la CTSL en distintos órganos y tejidos, a nuestro entender este es el primer trabajo que demuestra que la CTSL juega un rol en la regulación de la homeostasis del pool de células B. El hecho de que tanto la producción como la emigración de células B inmaduras desde la MO hacia el bazo aumentan en ausencia de actividad de CTSL, indica que esta proteasa regularía negativamente la producción y exportación de células B de la MO. Por lo tanto, el número de linfocitos B de la periferia resulta modulado por esta proteasa.**

# **Bibliografía**

1. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: S3-23.
2. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Principles of innate and adaptive immunity. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 2001. 5th edition, Garland Publishing.
3. Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 517-521.
4. Danilova N. The evolution of adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2012; 738: 218-235.
5. Behring EA, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der diphtheria immunitat und der tetanus immunität bei thieren. *Dtsch Med* 1890; 16: 1113-1145.
6. Ehrlich P. On immunity: with special reference to cell life. *Proc R Soc Lond* 1900; 66: 424-448.
7. Fagraeus A. The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J Immunol* 1948; 58: 1-13.
8. Cooper MD, Peterson RD, Good RA. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 1965; 205: 143-146.
9. Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, South MA, Good RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* 1966; 123: 75-102.
10. Coombs RR, Feinstein A, Wilson AB. Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes. *Lancet* 1969; 2: 1157-1160.
11. Fröland S, Natvig JB, Berdal P. Surface-bound immunoglobulin as a marker of B lymphocytes in man. *Nat New Biol* 1971; 234: 251-252.
12. Hardy, RR. B-lymphocyte development and biology. Fundamental Immunology 2003; 159-194. W.E. Paul, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
13. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 35-71.
14. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 759-806.
15. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404: 193-197.
16. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91: 661-672.
17. Tudor KS, Payne KJ, Yamashita Y, Kincade PW. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* 2000; 12: 335-345.

18. Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 2002; 17: 117-130.
19. Patterson HCK, Kraus M, Kim Y-M, Ploegh H, Rajewsky K. The B Cell Receptor Promotes B Cell Activation and Proliferation through a Non-ITAM Tyrosine in the Iga Cytoplasmic Domain. *Immunity* 2006; 25: 55–65.
20. Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Brière F *et al.* Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995; 268: 720-722.
21. Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 2005; 238: 67-75.
22. Sanchez M, Misulovin Z, Burkhardt AL, Mahajan S, Costa T, Franke R *et al.* Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *JEM* 1993; 178: 1049-1055.
23. Llewelyn MB, Hawkins RE, Russell SJ. Discovery of antibodies. *BMJ* 1992; 305: 1269-1272.
24. Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965; 54: 864-869.
25. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581.
26. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989; 59: 1035-1048.
27. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990; 248: 1517-1523.
28. Osmond DG, Rolink A, Melchers F. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today* 1998; 19: 65-68.
29. Allman D, Li J, Hardy RR. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med* 1999; 189: 735-740.
30. Li YS, Hayakawa K, Hardy RR. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med* 1993; 178: 951-960.
31. Karasuyama H, Kudo A, Melchers F. The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* 1990; 172: 969-972.
32. Tsubata T, Reth M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 1990; 172: 973-976.

33. Grawunder U, Leu TM, Schatz DG, Werner A, Rolink AG, Melchers F *et al.* Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 1995; 3: 601-608.
34. Karasuyama H, Rolink A, Shinkai Y, Young F, Alt FW, Melchers F. The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* 1994; 77: 133-143.
35. Parker MJ, Licence S, Erlandsson L, Galler GR, Chakalova L, Osborne CS *et al.* The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO J* 2005; 24: 3895-3905.
36. Ehlich A, Martin V, Müller W, Rajewsky K. Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 1994; 4: 573-583.
37. ten Boekel E, Melchers F, Rolink A. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development. *Int Immunol* 1995; 7: 1013-1019.
38. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P *et al.* Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 214-227.
39. Vitetta ES, Melcher U, McWilliams M, Lamm ME, Phillips-Quagliata JM, Uhr JW. Cell surface immunoglobulin. XI. The appearance of an IgD-like molecule on murine lymphoid cells during ontogeny. *J Exp Med* 1975; 141: 206-215.
40. Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F. Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 202-207.
41. Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 578-584.
42. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 195-205.
43. Meng W, Yunk L, Wang LS, Maganty A, Xue E, Cohen PL *et al.* Selection of individual VH genes occurs at the pro-B to pre-B cell transition. *J Immunol* 2011; 187: 1835-1844.
44. ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG. Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor. *Immunity* 1997; 7: 357-368.
45. Minegishi Y, Conley ME. Negative selection at the pre-BCR checkpoint elicited by human mu heavy chains with unusual CDR3 regions. *Immunity* 2001; 14: 631-641.
46. Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 1992; 356: 154-156.

47. Melchers F, ten Boekel E, Yamagami T, Andersson J, Rolink A. The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin Immunol* 1999; 11: 307-317.
48. Seagal J, Melamed D. Selection events in directing B cell development. *Histol Histopathol* 2003; 18: 519-527.
49. Reichman-Fried M, Hardy RR, Bosma MJ. Development of B-lineage cells in the bone marrow of scid/scid mice following the introduction of functionally rearranged immunoglobulin transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2730–2734.
50. Young F, Ardman B, Shinkai Y, Lansford R, Blackwell TK, Mendelsohn M *et al.* Influence of immunoglobulin heavy- and light-chain expression on B-cell differentiation. *Genes Dev* 1994; 8: 1043-1057.
51. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; 68: 869-877.
52. Spanopoulou E, Roman CA, Corcoran LM, Schlissel MS, Silver DP, Nemazee D *et al.* Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice. *Genes Dev* 1994; 8: 1030-1042.
53. Ehlich A, Schaal S, Gu H, Kitamura D, Müller W, Rajewsky K. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* 1993; 72: 695-704.
54. Gong S, Nussenzweig MC. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 1996; 272: 411-414.
55. Keenan, RA, De Riva A, Corleis B, Hepburn L, Licence S, Winkler TH *et al.* Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* 2008, 321: 696–699.
56. Osmond DG. Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr Opin Immunol* 1991; 32: 179-185.
57. Osmond DG. The turnover of B-cell populations. *Immunol Today* 1993; 14: 34-37.
58. Rolink AG, Andersson J, Melchers F. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3738-3748.
59. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 595-621.
60. Tussiwand R, Bosco N, Ceredig R, Rolink AG. Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2317-2324.
61. Buhl AM, Nemazee D, Cambier JC, Rickert R, Hertz M. B-cell antigen receptor competence regulates B-lymphocyte selection and survival. *Immunol Rev* 2000; 176: 141-153.

62. Diamant E, Keren Z, Melamed D. CD19 regulates positive selection and maturation in B lymphopoiesis: lack of CD19 imposes developmental arrest of immature B cells and consequential stimulation of receptor editing. *Blood* 2005; 105: 3247-3254.
63. Fuentes-Pananá EM, Bannish G, Monroe JG. Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunol Rev* 2004; 197: 26-40.
64. Hayashi K, Nojima T, Goitsuka R, Kitamura D. Impaired receptor editing in the primary B cell repertoire of BASH-deficient mice. *J Immunol* 2004; 173: 5980-5988.
65. Tze LE, Schram BR, Lam KP, Hogquist KA, Hippen KL, Liu J *et al.* Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol* 2005; 3: e82.
66. Verkoczy L, Duong B, Skog P, Aït-Azzouzene D, Puri K, Vela JL *et al.* Basal B cell receptor-directed phosphatidylinositol 3-kinase signaling turns off RAGs and promotes B cell-positive selection. *J Immunol* 2007; 178: 6332-6341.
67. Kouskoff V, Lacaud G, Pape K, Retter M, Nemazee D. B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7435-7439.
68. Keren Z, Diamant E, Ostrovsky O, Bengal E, Melamed D. Modification of ligand-independent B cell receptor tonic signals activates receptor editing in immature B lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 13418-13424.
69. Pelanda R, Torres RM. Receptor editing for better or for worse. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 184-190.
70. Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 1995; 3: 39-50.
71. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991; 173: 1213-1225.
72. Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Melchers F. IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* 1994; 6: 1257-1264.
73. Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 1996; 5: 527-535.

74. Tudor KS, Payne KJ, Yamashita Y, Kincade PW. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* 2000; 12: 335-345.
75. Rumpf LL, Zhou Y, Rowley BM, Shinton SA, Hardy RR. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med* 2006; 203: 675-687.
76. Van Epps HL. Bringing order to early B cell chaos. *J Exp Med* 2006; 203: 1389.
77. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000; 102: 553-563.
78. Chaudhuri J, Basu U, Zarrin A, Yan C, Franco S, Perlot T *et al.* Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* 2007; 94: 157-214.
79. Durandy A, Taubenheim N, Peron S, Fischer A. Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Adv Immunol* 2007; 94: 275-306.
80. Malisan F, Brière F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE *et al.* Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 183: 937-947.
81. Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol* 2010; 47: 2154-2160.
82. He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM *et al.* HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 2006; 176: 3931-3941.
83. Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE *et al.* FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 2006; 108: 3573-3579.
84. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* 2008; 111: 1456-1463.
85. Yanagihara Y, Ikizawa K, Kajiwara K, Koshio T, Basaki Y, Akiyama K. Functional significance of IL-4 receptor on B cells in IL-4-induced human IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 1145-1151.
86. Minciullo PL, Cascio A, David A, Pernice LM, Calapai G, Gangemi S. Anaphylaxis caused by helminths: review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16: 1513-1518.

87. Fritz JH, Rojas OL, Simard N, McCarthy DD, Hapfelmeier S, Rubino S *et al.* Acquisition of a multifunctional IgA<sup>+</sup> plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 2011; 481: 199-203.
88. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 149-157.
89. Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood* 2007; 109: 2339-2345.
90. Shahaf G, Allman D, Cancro MP, Mehr R. Screening of alternative models for transitional B cell maturation. *Int Immunol* 2004; 16: 1081-1090.
91. Su TT, Rawlings DJ. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol* 2002; 168: 2101-2110.
92. Allman DM, Ferguson SE, Cancro MP. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen<sup>hi</sup> and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol* 1992; 149: 2533-2540.
93. Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen<sup>hi</sup> splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 1993; 151: 4431-4444.
94. Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 2001; 167: 6834-6840.
95. Carsetti R, Köhler G, Lamers MC. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 1995; 181: 2129-2140.
96. Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994; 76: 229-239.
97. Khan WN. B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol* 2009; 183: 3561-3567.
98. Petro JB, Gerstein RM, Lowe J, Carter RS, Shinnars N, Khan WN. Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 2002; 277: 48009-48019.
99. Cyster JG, Healy JI, Kishihara K, Mak TW, Thomas ML, Goodnow CC. Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 1996; 381: 325-328.
100. Levine MH, Haberman AM, Sant'Angelo DB, Hannum LG, Cancro MP, Janeway CA Jr *et al.* A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2743-2748.

101. Bannish G, Fuentes-Pananá EM, Cambier JC, Pear WS, Monroe JG. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *J Exp Med* 2001; 194: 1583-1596.
102. Cancro MP, Kearney JF. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J Immunol* 2004; 173: 15-19.
103. Harless SM, Lentz VM, Sah AP, Hsu BL, Clise-Dwyer K, Hilbert DM *et al.* Competition for BLYS-mediated signaling through Bcnd/BR3 regulates peripheral B lymphocyte numbers. *Curr Biol* 2001; 11: 1986-1989.
104. Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP. Cutting edge: BLYS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol* 2002; 168: 5993-5996.
105. Cancro MP. Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. *Immunol Rev* 2004; 197: 89-101.
106. Lentz VM, Cancro MP, Nashold FE, Hayes CE. Bcnd governs recruitment of new B cells into the stable peripheral B cell pool in the A/WySnJ mouse. *J Immunol* 1996; 157: 598-606.
107. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J *et al.* BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 1453-1466.
108. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998; 281: 96-99.
109. Rodríguez-Pinto D, Moreno J. B cells can prime naive CD4<sup>+</sup> T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1097-1105.
110. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 1991; 173: 1165-1175.
111. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2951-2962.
112. MacLennan ICM. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 117-139.
113. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev* 1997; 156: 111-126.
114. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010; 143: 592-605.

115. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; 27: 190-202.
116. Tarlinton DM. Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 133-138.
117. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 853-865.
118. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004; 5: 943-952.
119. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL *et al.* Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 2000; 176: 181-193.
120. Förster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C *et al.* Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol* 1998; 160: 1522-1531.
121. Liu YJ, Malisan F, de Bouteiller O, Guret C, Lebecque S, Banchereau J *et al.* Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 1996; 4: 241-250.
122. Cattoretti G, Büttner M, Shaknovich R, Kremmer E, Alobeid B, Niedobitek G. Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 2006; 107: 3967-3975.
123. Tarlinton DM, Smith KG. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunol Today* 2000; 21: 436-441.
124. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2065-2075.
125. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188: 1679-1689.
126. Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med* 2005; 201: 545-554.
127. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 253-300.

128. Kroese FG, Ammerlaan WA, Deenen GJ. Location and function of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 651: 44-58.
129. Wortis HH, Berland R. Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol* 2001; 166: 2163-2166.
130. Rothstein TL. Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunol* 2002; 168: 4257-4261.
131. Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 501-538.
132. Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Kantor AB. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 651: 33-43.
133. O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 1992; 22: 711-717.
134. Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 1992; 175: 1213-1220.
135. Kantor AB, Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3320-3324.
136. Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 2000; 175: 9-22.
137. Solvason N, Wu WW, Parry D, Mahony D, Lam EW, Glassford J, Klaus GG, Sicinski P, Weinberg R, Liu YJ, Howard M, Lees E. Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. *Int Immunol* 2000; 12: 631-638.
138. Xu S, Wong SC, Lam KP. Cutting edge: B cell linker protein is dispensable for the allelic exclusion of immunoglobulin heavy chain locus but required for the persistence of CD5+ B cells. *J Immunol* 2000; 165: 4153-4157.
139. Tumang JR, Hastings WD, Bai C, Rothstein TL. Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypic, functional, and transcriptomic characteristics. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2158-2167.
140. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J.A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense Against Systemic Bacterial Infection *J Exp Med* 1998; 188: 2381-2386.
141. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H *et al.* Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 1999; 286: 2156-2159.

142. Masmoudi H, Mota-Santos T, Huetz F, Coutinho A, Cazenave PA. All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes. *Int Immunol* 1990; 2: 515-520.
143. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD, Herzenberg LA. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 2494-2498.
144. Yother J, Forman C, Gray BM, Briles DE. Protection of mice from infection with *Streptococcus pneumoniae* by anti-phosphocholine antibody. *Infect Immun* 1982; 36: 184-188.
145. Briles DE, Nahm M, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J *et al.* Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J Exp Med* 1981; 153: 694-705.
146. Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 403-408.
147. Kroese FG, Butcher EC, Stall AM, Lalor PA, Adams S, Herzenberg LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1989; 1: 75-84.
148. S Bao, K W Beagley, A M Murray, V Caristo, K I Matthaei, I G Young *et al.* Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology* 1998; 94: 181-188.
149. Stall AM, Fariñas MC, Tarlinton DM, Lalor PA, Herzenberg LA, Strober S *et al.* Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7312-7316.
150. Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2105-2111.
151. Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC. Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning Microsc* 1993; 7: 613-628.
152. Cinamon G, Matloubian M, Lesneski MJ, Xu Y, Low C, Lu T *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 2004; 5: 713-720.
153. Vora KA, Nichols E, Porter G, Cui Y, Keohane CA, Hajdu R *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720-phosphate causes marginal zone B cell displacement. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 471-480.
154. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 1999; 162: 7198-7207.

155. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 161-196.
156. Cariappa A, Tang M, Parng C, Nebelitskiy E, Carroll M, Georgopoulos K *et al.* The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 2001; 14: 603-615.
157. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol Rev* 2004; 197: 206-218.
158. Niiro H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 945-956.
159. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K *et al.* Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 2003; 18: 675-685.
160. Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N *et al.* Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* 2004; 5: 638-644.
161. Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 4-11.
162. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001; 14: 617-629.
163. Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 2000; 1: 31-36.
164. Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 2002; 17: 341-352.
165. Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol* 2004; 172: 803-811.
166. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zúñiga E *et al.* Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 2003; 194: 8-18.
167. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 2002; 297: 2066-2070.
168. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 2008; 9: 54-62.

169. Song H, Cerny J. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* 2003; 198: 1923-1935.
170. Khaldoyanidi S, Sikora L, Orlovskaya I, Matrosova V, Kozlov V, Sriramarao P. Correlation between nicotine-induced inhibition of hematopoiesis and decreased CD44 expression on bone marrow stromal cells. *Blood* 2001; 98: 303-312.
171. Lichtman MA. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. *Exp Hematol* 1981; 9: 391-410.
172. Hubin F, Humblet C, Belaid Z, Lambert C, Boniver J, Thiry A *et al.* Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *Stem Cells* 2005; 23: 1626-1633.
173. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992; 49: 225-233.
174. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 165-181.
175. Witte PL, Frantsve LM, Hergott M, Rahbe SM. Cytokine production and heterogeneity of primary stromal cells that support B lymphopoiesis. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1809-1817.
176. Kincade PW. B lymphopoiesis: global factors, local control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2888-2889.
177. Oritani K, Kincade PW. Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol* 1996; 134: 771-782.
178. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 1991; 173: 599-607.
179. Dittel BN, McCarthy JB, Wayner EA, LeBien TW. Regulation of human B-cell precursor adhesion to bone marrow stromal cells by cytokines that exert opposing effects on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Blood* 1993; 81: 2272-2282.
180. Jarvis LJ, Maguire JE, LeBien TW. Contact between human bone marrow stromal cells and B lymphocytes enhances very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1-independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and ERK2 in stromal cells. *Blood* 1997; 90: 1626-1635.
181. Xiao J, Messinger Y, Jin J, Myers DE, Bolen JB, Uckun FM. Signal transduction through the beta1 integrin family surface adhesion molecules VLA-4 and VLA-5 of human B-cell precursors activates CD19 receptor-associated protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 7659-7664.

182. Zuckerman KS, Wicha MS. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood* 1983; 61: 540-547.
183. Campbell A, Wicha MS, Long M. Extracellular matrix promotes the growth and differentiation of murine hematopoietic cells in vitro. *J Clin Invest* 1985; 75: 2085-2090.
184. Tavassoli M, Takahashi K. Morphological studies on long-term culture of marrow cells: characterization of the adherent stromal cells and their interactions in maintaining the proliferation of hemopoietic stem cells. *Am J Anat* 1982; 164: 91-111.
185. Allen TD, Dexter TM. Long term bone marrow cultures: an ultrastructural review. *Scan Electron Microsc* 1983; (Pt 4): 1851-1866.
186. Perkins S, Fleischman RA. Hematopoietic microenvironment. Origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice. *J Clin Invest* 1988; 81: 1072-1080.
187. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1301-1305.
188. Roodman GD. Osteoclast differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 389-409.
189. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 2005; 435: 969-973.
190. De Bruyn PP, Breen PC, Thomas TB. The microcirculation of the bone marrow. *Anat Rec* 1970; 168: 55-68.
191. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1-18.
192. Loomans CJ, Wan H, de Crom R, van Haperen R, de Boer HC, Leenen PJ *et al.* Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial NO synthase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1760-1767.
193. Stephan RP, Reilly CR, Witte PL. Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age. *Blood* 1998; 91: 75-88.
194. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 107-116.
195. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl* 1982; 1: 87-94.

196. Krings A, Rahman S, Huang S, Lu Y, Czernik PJ, Lecka-Czernik B. Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* 2012; 50: 546-552.
197. Yu WH, Li FG, Chen XY, Li JT, Wu YH, Huang LH *et al.* PPAR $\gamma$  suppression inhibits adipogenesis but does not promote osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 377-384.
198. Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, Liu Y, Sun X *et al.* Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC Dev Biol* 2010; 10: 47.
199. Bianco P, Costantini M, Dearden LC, Bonucci E. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol* 1988; 68: 401-403.
200. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192.
201. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 1996; 19: 421-428.
202. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 2005; 11: 76-81.
203. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 100-119.
204. Zaidi M, Pazianas M, Shankar VS, Bax BE, Bax CM, Bevis PJ *et al.* Osteoclast function and its control. *Exp Physiol* 1993; 78: 721-739.
205. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 3): 377-381.
206. Mohandas N, Prenant M. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood* 1978; 51: 633-643.
207. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K *et al.* Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 1232-1244.
208. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000; 96: 9-23.
209. Kouro T, Medina KL, Oritani K, Kincade PW. Characteristics of early murine B-lymphocyte precursors and their direct sensitivity to negative regulators. *Blood* 2001; 97: 2708-2715.
210. Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, Amada K, Okamoto R, Fujii N *et al.* The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 2001; 15: 323-334.

211. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J *et al.* The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-833.
212. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635-638.
213. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9448-9453.
214. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004; 20: 707-718.
215. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999; 10: 463-471.
216. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 2004; 200: 1145-1156.
217. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 2001; 194: 45-56.
218. Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG *et al.* Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* 1996; 10: 1012-1018.
219. Hunte BE, Hudak S, Campbell D, Xu Y, Rennick D. flk2/flt3 ligand is a potent cofactor for the growth of primitive B cell progenitors. *J Immunol* 1996; 156: 489-496.
220. Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 2002; 17: 463-472.
221. Li LX, Goetz CA, Katerndahl CD, Sakaguchi N, Farrar MA. A Flt3- and Ras-dependent pathway primes B cell development by inducing a state of IL-7 responsiveness. *J Immunol* 2010; 184: 1728-1736.
222. Sitnicka E, Brakebusch C, Martensson IL, Svensson M, Agace WW, Sigvardsson M *et al.* Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *J Exp Med* 2003; 198: 1495-1506.

223. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A *et al.* Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 1988; 333: 571-573.
224. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC *et al.* Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180: 1955-1960.
225. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995; 181: 1519-1526.
226. Corcoran AE, Riddell A, Krooshoop D, Venkitaraman AR. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 1998; 391: 904-907.
227. Corfe SA, Paige CJ. The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol* 2012; 24: 198-208.
228. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003; 426: 671-676.
229. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH *et al.* Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 1990; 63: 203-211.
230. McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* 1991; 146: 3785-3790.
231. Waskow C, Paul S, Haller C, Gassmann M, Rodewald HR. Viable c-Kit (W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* 2002; 17: 277-288.
232. Leberman DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect* 1999; 1: 1297-1304.
233. Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 1989; 142: 3875-3883.
234. Garvy BA, Riley RL. IFN-gamma abrogates IL-7-dependent proliferation in pre-B cells, coinciding with onset of apoptosis. *Immunology* 1994; 81: 381-388.
235. Grawunder U, Melchers F, Rolink A. Interferon-gamma arrests proliferation and causes apoptosis in stromal cell/interleukin-7-dependent normal murine pre-B cell lines and clones in vitro, but does not induce differentiation to surface immunoglobulin-positive B cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 544-551.

236. Young HA, Klinman DM, Reynolds DA, Grzegorzewski KJ, Nii A, Ward JM *et al.* Bone marrow and thymus expression of interferon-gamma results in severe B-cell lineage reduction, T-cell lineage alterations, and hematopoietic progenitor deficiencies. *Blood* 1997; 89: 583-595.
237. Sugiyama T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012; 11: 201-216.
238. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 12: 49-60.
239. Mourcin F, Breton C, Tellier J, Narang P, Chasson L, Jorquera A *et al.* Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood* 2011; 117: 6552-6561.
240. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425: 841-846.
241. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841.
242. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 2004; 103: 3258-3264.
243. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J *et al.* Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 2007; 109: 3706-3712.
244. Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI *et al.* Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 2006; 38: 497-508.
245. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999; 13: 2412-2424.
246. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD *et al.* Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997; 11: 3482-3496.
247. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-323.
248. Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K *et al.* Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 1999; 4: 353-362.
249. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Sexton PM, Rochet N, Carle GF. Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia* 2004; 18: 1505-1511.

250. Scimeca JC, Franchi A, Trojani C, Parrinello H, Grosgeorge J, Robert C *et al.* The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. *Bone* 2000; 26: 207-213.
251. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, Carle GF. Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mice. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1137-1143.
252. Wakkach A, Mansour A, Dacquin R, Coste E, Jurdic P, Carle GF *et al.* Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* 2008; 112: 5074-5083.
253. Mansour A, Anginot A, Mancini SJ, Schiff C, Carle GF, Wakkach A *et al.* Osteoclast activity modulates B-cell development in the bone marrow. *Cell Res* 2011; 21: 1102-1115.
254. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25: 977-988.
255. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K *et al.* The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010; 33: 387-399.
256. Pereira JP, Kelly LM, Cyster JG. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol* 2010; 22: 413-419.
257. Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 618-629.
258. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33.
259. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12694-12699.
260. Stein JV, Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 2005; 116: 1-12.
261. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL *et al.* Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 2000; 176: 181-193.
262. Allen CD, Cyster JG. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 2008; 20: 14-25.

263. Katakai T, Suto H, Sugai M, Gonda H, Togawa A, Suematsu S *et al.* Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2008; 181: 6189-6200.
264. Katakai T. Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front Immunol* 2012; 3: 200.
265. Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Förster R *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 2002; 416: 94-99.
266. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 2007; 179: 5099-5108.
267. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995; 16: 449-457.
268. Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC. Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning Microsc* 1993; 7: 613-628.
269. Kraal G. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 1992; 132: 31-74.
270. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000; 406: 309-314.
271. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 544-558.
272. Barrett AJ, Rawlings ND. 'Species' of peptidases. *Biol Chem* 2007; 388: 1151-1157.
273. Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D270-272.
274. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D320-325.
275. Turk D, Guncar G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003; 59: 203-213.
276. Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 2001; 20: 4629-4633.
277. Jean D, Hermann J, Rodrigues-Lima F, Barel M, Balbo M, Frade R. Identification on melanoma cells of p39, a cysteine proteinase that cleaves C3, the third component of complement: amino-acid-sequence identities with procathepsin L. *Biochem J* 1995; 312: 961-969.
278. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 98-111.

279. Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A *et al.* Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 2000; 14: 2075-2086.
280. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 1981; 80: 535-561.
281. Shaw E, Dean RT. The inhibition of macrophage protein turnover by a selective inhibitor of thiol proteinases. *Biochem J* 1980; 186: 385-390.
282. Wartmann T, Mayerle J, Kähne T, Sahin-Tóth M, Ruthenbürger M, Matthias R *et al.* Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2010; 138: 726-737.
283. Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2580-2585.
284. Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, Möller CC, Ko D, Wei C *et al.* Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 2095-2104.
285. Reiser J, Oh J, Shirato I, Asanuma K, Hug A, Mundel TM *et al.* Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J Biol Chem* 2004; 279: 34827-34832.
286. Goulet B, Baruch A, Moon NS, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A *et al.* A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell* 2004; 14: 207-219.
287. Abudula A, Rommerskirch W, Weber E, Günther D, Wiederanders B. Splice variants of human cathepsin L mRNA show different expression rates. *Biol Chem* 2001; 382: 1583-1591.
288. Müntener K, Zwicky R, Csucs G, Rohrer J, Baici A. Exon skipping of cathepsin B: mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death. *J Biol Chem* 2004; 279: 41012-41017.
289. Katunuma N, Kakegawa H, Matsunaga Y, Nikawa T, Kominami E. Different functional share of individual lysosomal cathepsins in normal and pathological conditions. *Agents Actions Suppl* 1993; 42: 195-210.
290. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991; 285: 213-219.

291. Guncar G, Pungercic G, Klemencic I, Turk V, Turk D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J* 1999; 18: 793-803.
292. Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett* 1995; 363: 85-89.
293. Bohley P, Seglen PO. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 1992; 48: 151-157.
294. Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 2008; 90: 194-207.
295. Yasothornsrikul S, Greenbaum D, Medzihradzky KF, Toneff T, Bunday R, Miller R *et al.* Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci US A* 2003; 100: 9590-9595.
296. Honey K, Nakagawa T, Peters C, Rudensky A. Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med* 2002; 195: 1349-1358.
297. Kirschke H, Kembhavi AA, Bohley P, Barrett AJ. Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. *Biochem J* 1982; 201: 367-372.
298. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 2000; 19: 1187-1194.
299. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J *et al.* The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008; 14: 931-938.
300. Duncan EM, Muratore-Schroeder TL, Cook RG, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF *et al.* Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 2008; 135: 284-294.
301. Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A *et al.* Cathepsin L deficiency as molecular defect of *furless*: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 2000; 14: 2075-2086.
302. Tobin DJ, Foitzik K, Reinheckel T, Mecklenburg L, Botchkarev VA, Peters C *et al.* The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 2002; 160: 1807-1821.

303. Reinheckel T, Hagemann S, Dollwet-Mack S, Martinez E, Lohmüller T, Zlatkovic G *et al.* The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci* 2005; 118: 3387-3395.
304. Benavides F, Starost MF, Flores M, Gimenez-Conti IB, Guénet JL, Conti CJ. Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L-deficient mutation. *Am J Pathol* 2002; 161: 693-703.
305. Stypmann J, Gläser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R *et al.* Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6234-6239.
306. Petermann I, Mayer C, Stypmann J, Biniossek ML, Tobin DJ, Engelen M *et al.* Lysosomal, cytoskeletal, and metabolic alterations in cardiomyopathy of cathepsin L knockout mice. *FASEB J* 2006; 20: 1266-1268.
307. Tang Q, Cai J, Shen D, Bian Z, Yan L, Wang YX *et al.* Lysosomal cysteine peptidase cathepsin L protects against cardiac hypertrophy through blocking AKT/GSK3beta signaling. *J Mol Med* 2009; 87: 249-260.
308. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR *et al.* Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* 2005; 11: 206-213.
309. Stahl S, Reinders Y, Asan E, Mothes W, Conzelmann E, Sickmann A *et al.* Proteomic analysis of cathepsin B- and L-deficient mouse brain lysosomes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774: 1237-1246.
310. Maciewicz RA, Etherington DJ. A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem J* 1988; 256: 433-440.
311. Chapman HA Jr, Munger JS, Shi GP. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: S155-159.
312. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1251-1266.
313. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J *et al.* Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 1998; 280: 450-453.
314. Bylaite M, Moussali H, Marciukaitiene I, Ruzicka T, Walz M. Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin diseases. *Exp Dermatol* 2006; 15: 110-118.
315. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 387-403.

316. Benavides F, Giordano M, Fiette L, Bueno Brunialti AL, Martin Palenzuela N, Vanzulli S *et al.* Nackt (nkt), a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency. *Immunogenetics* 1999; 49: 413-419.
317. Nepomnaschy I, Lombardi G, Bekinschtein P, Berguer P, Francisco V, de Almeida J *et al.* Alterations during positive selection in the thymus of nackt CD4-deficient mice. *Scand J Immunol* 2000; 52: 555-562.
318. Wright WW, Smith L, Kerr C, Charron M. Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biol Reprod* 2003; 68: 680-687.
319. Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, Deussing J, von Figura K, Herzog V *et al.* Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1733-1745.
320. Alcalay NI, Sharma M, Vassmer D, Chapman B, Paul B, Zhou J *et al.* Acceleration of polycystic kidney disease progression in cpk mice carrying a deletion in the homeodomain protein Cux1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1725-1734.
321. Felbor U, Kessler B, Mothes W, Goebel HH, Ploegh HL, Bronson RT *et al.* Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7883-7888.
322. Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 2007; 6: 60-64.
323. Jedeszko C, Sloane BF. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* 2004; 385: 1017-1027.
324. Hashimoto Y, Kondo C, Kojima T, Nagata H, Moriyama A, Hayakawa T *et al.* Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm* 2006; 21: 217-224.
325. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 764-775.
326. Strojnik T, Kavalar R, Trinkaus M, Lah TT. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 448-455.
327. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 93-102.
328. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990; 345: 615-618.
329. Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson L, Schmid SL *et al.* Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 1990; 348: 600-605.
330. Stumptner P, Benaroch P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J* 1997; 16: 5807-5818.

331. Roche PA. HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity*; 3: 259-262.
332. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996; 84: 505-507.
333. Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL *et al.* Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996; 4: 357-366.
334. Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J *et al.* Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 1999; 10: 207-217.
335. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ *et al.* Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 1999; 10: 197-206.
336. Nakagawa TY, Rudensky AY. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 1999; 172: 121-179.
337. Kovats S, Grubin CE, Eastman S, deRoos P, Dongre A, Van Kaer L *et al.* Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J Exp Med* 1998; 187: 245-251.
338. Tourne S, Miyazaki T, Wolf P, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 9255-9260.
339. Barton GM, Rudensky AY. Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science* 1999; 283: 67-70.
340. Benavides F, Giordano M, Fiette L, Bueno Brunialti AL, Martin Palenzuela N, Vanzulli S *et al.* Nactt (*nkt*), a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency. *Immunogenetics* 1999; 49: 413-419.
341. Benavides F, Venables A, Poetschke Klug H, Glasscock E, Rudensky A, Gómez M *et al.* The CD4 T cell-deficient mouse mutation nactt (*nkt*) involves a deletion in the cathepsin L (CtsL) gene. *Immunogenetics* 2001; 53: 233-242.
342. Chauhan SS, Popescu NC, Ray D, Fleischmann R, Gottesman MM, Troen BR. Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J. Biol Chem* 1993; 268: 1039-1045.

343. Lombardi G, Burzyn D, Mundiñano J, Berguer P, Bekinschtein P, Costa H *et al.* Cathepsin-L influences the expression of extracellular matrix in lymphoid organs and plays a role in the regulation of thymic output and of peripheral T cell number. *J Immunol.* 2005; 174: 7022-7032.
344. Dufour E. Sequence homologies, hydrophobic profiles and secondary structures of cathepsins B, H and L: comparison with papain and actinidin. *Biochimie* 1988; 70: 1335-1342.
345. Smith SM, Gottesman MM. Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1989; 264: 20487-20495.
346. Ellis TM, Moser MT, Le PT, Flanigan RC, Kwon ED. Alterations in peripheral B cells and B cell progenitors following androgen ablation in mice. *Int Immunol* 2001; 13: 553-558.
347. Schmid I, Cole SW, Zack JA, Giorgi JV. Measurement of lymphocyte subset proliferation by three-color immunofluorescence and DNA flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 235: 121-131.
348. Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ *et al.* Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 494-502.
349. Otero DC, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *J Immunol* 2003; 171: 5921-5930.
350. Barbier V, Nowlan B, Lévesque JP, Winkler IG. Flow cytometry analysis of cell cycling and proliferation in mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Methods Mol Biol* 2012; 844: 31-43.
351. Cancro MP, Allman DM, Hayes CE, Lentz VM, Fields RG, Sah AP *et al.* B cell maturation and selection at the marrow-periphery interface. *Immunol Res* 1998; 17: 3-11.
352. Sater RA, Sandel PC, Monroe JG. B cell receptor-induced apoptosis in primary transitional murine B cells: signaling requirements and modulation by T cell help. *Int Immunol* 1998; 10: 1673-1682.
353. Cariappa A, Kim TJ, Pillai S. Accelerated emigration of B lymphocytes in the Xid mouse. *J Immunol* 1999; 162: 4417-4423.
354. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* 2006; 177: 192-200.

355. Camicia G, Ricariddi M, Lombardi G, Costa H, Mundiniano J, Lorenzo D *et al.* High numbers of B cells correlates with increases in lymph node extracellular matrix components in cathepsin-L mutant mice. *Immunology* 2007. Bologna: Monduzzi, 2007: 537-540.
356. Bourdeau A, Dubé N, Heinonen KM, Théberge JF, Doody KM, Tremblay ML. TC-PTP-deficient bone marrow stromal cells fail to support normal B lymphopoiesis due to abnormal secretion of interferon- $\gamma$ . *Blood* 2007; 109: 4220-4228.
357. Chou WC, Levy DE, Lee CK. STAT3 positively regulates an early step in B-cell development. *Blood* 2006; 108: 3005-3011.
358. Cochrane SW, Zhao Y, Perry SS, Urbaniak T, Sun XH. Id1 has a physiological role in regulating early B lymphopoiesis. *Cell Mol Immunol* 2011; 8: 41-49.
359. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K. Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 1992; 80: 1207-1212.
360. Gibson LF, Piktel D, Landreth KS. Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. *Blood* 1993; 82: 3005-3011.
361. Rudman SM, Philpott MP, Thomas GA, Kealey T. Insulinlike growth factor-binding protein proteolysis an emerging paradigm in insulinlike growth factor physiology. *Trends Endocrinol Metab* 1997, 8:299-306.
362. Zwad O, Kübler B, Roth W, Scharf JG, Saftig P, Peters C *et al.* Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L-deficient fibroblasts. *FEBS Lett* 2002; 510: 211-215.
363. Sun M, Chen M, Liu Y, Fukuoka M, Zhou K, Li G *et al.* Cathepsin-L contributes to cardiac repair and remodelling post-infarction. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 374-383.
364. Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B *et al.* Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 1046-1056.
365. Dennemärker J, Lohmüller T, Mayerle J, Tacke M, Lerch MM, Coussens LM *et al.* Deficiency for the cysteine protease cathepsin L promotes tumor progression in mouse epidermis. *Oncogene* 2010; 29: 1611-1621.
366. Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, Cato MH, Rickert RC. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 178-183.