



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**Facultad de Medicina
Departamento de Biología Molecular**

***“ApoE, un modulador de la inflamación en la
artritis inducida por colágeno”***

Directores:

**Dr. Jesús Merino Pérez
Dr. Ramón Merino Pérez**

**Tesis doctoral presentada por Fernanda Genre
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Marzo de 2013**



Dr. Jesús Merino Pérez
Catedrático de Inmunología
Dpto Biología Molecular (Facultad de Medicina)
Universidad de Cantabria - IFIMAV
Tf: 942 201956 Fax 942 201945
e-mail merinoj@unican.es

Jesús Merino Pérez, Catedrático de Inmunología de la Universidad de Cantabria y Coordinador del grupo de investigación “Inmunopatología”

EXPONE: que Dña. Fernanda Genre, Licenciada en Biología ha desarrollado bajo mi dirección el proyecto de Tesis Doctoral “***ApoE, un modulador de la inflamación en la artritis inducida por colágeno***”.

Considero que el trabajo es original, plantea unos objetivos razonables y los aborda con la metodología adecuada, consiguiendo unos resultados que soportan las conclusiones a las que finalmente llega. Considero, por lo tanto, que el trabajo reúne criterios suficientes para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Lo que hace constar en Santander a ocho de marzo de dos mil trece.

Fdo: Jesús Merino Pérez

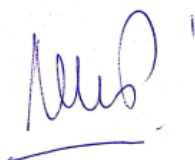


Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-Sodercan, Profesor Asociado del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: que Dña. Fernanda Genre, Licenciada en Biología ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “*ApoE, un modulador de la inflamación en la artritis inducida por colágeno*“, cuya parte experimental se ha realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Considero que los objetivos planteados están razonablemente desarrollados y fundamenta las conclusiones a las que se llega. Por lo tanto, el trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 8 de marzo de 2013



Ramón Merino Pérez

A mis padres y Julieta

Agradecimientos

En estos años de tesis me he tenido que mover por diferentes laboratorios para aprender diferentes técnicas, pero gracias a ello no sólo aprendí dichas metodologías, sino que también conocí gente maravillosa en el camino, siempre dispuesta a colaborar, y a quienes me gustaría agradecer.

Quisiera agradecer...

A Jesús y a Ramón, por abrirme las puertas de este laboratorio, en el cual he podido continuar completando mi formación, aprendiendo muchísimas más técnicas de las que hubiera imaginado. Gracias por guiarme, orientarme y formarme en estos años. Principalmente quiero agradecer a Jesús, por responder tan rápido a ese e-mail gracias al cual estoy aquí en España.

A la gente de Inmuno: Natali, gracias por estar siempre ahí, para ayudar con los experimentos, para dar apoyo moral, para hacer reír, por estar siempre dispuesta a ayudar cuando lo necesitaba. Sos genial, lo sabés. Marquitos, gracias por enseñarme tanto siempre que lo necesité, y por amenizar cada minuto que he estado en el laboratorio, haciéndome reír con tus bailes y cantos, y por esas charlas filosóficas en el animalario. Maigüi, gracias también por enseñarme a manipular los ratones y por acogerme en tu familia como una más. María, gracias por esas citometrías y por los buenos momentos que hemos pasado juntas. Jorge, gracias por recogerme en el aeropuerto de Bilbao el día que llegué, por ayudarme siempre que te lo pedí y por los momentos compartidos. Iván, gracias por esa paz interior que me transmitías por las mañanas y por esos preciosos cortes de aorta que me has hecho. Juanje, mi compañero de escritorio por unos meses, gracias por ofrecerme siempre una sonrisa y por ser tan buen compañero. Thais, vaya personaje, me he reído mucho contigo. Pilar, me has ayudado mucho en mis últimos meses, y te deseo muchísima suerte con el “legado” que te he dejado. Y a Diana y Javi, porque si bien su paso por Inmuno fue breve, ha sido suficiente para crear una gran amistad entre nosotros.

A los “Pieros”, mi primer “segundo laboratorio”: Lore, porque hemos congeniado bien desde el primer día y tanto vos como tu familia han sido siempre super generosos conmigo. Por ser mi gurú de los experimentos. Por todo lo que me has ayudado... Javi y Adán, gracias por esas excursiones de senderismo que me han hecho conocer paisajes maravillosos de la región y que me han ayudado a despejar un poco la mente de los experimentos. A todos ustedes (los que quedan y los que ya han partido a nuevos rumbos): Lore, Adán, Javi, Ana, Chipi y Paula, gracias por ayudarme con cualquier cosa que necesitase y por hacerme un huequito en vuestra poyata tantas veces, como si fuera una más de vuestro grupo.

A la gente de Bioquímica, mi siguiente “segundo laboratorio”: Fonso y Javi, gracias por la paciencia, por los meses dedicados a enseñarme y por el buen ambiente generado que hacía mucho más fácil trabajar con ustedes y no desanimarme por los resultados negativos. Juan y Manu, dos personas siempre dispuestas a ayudar. Una gran suerte haberlos conocido. Eva, Maña, Andrea, Rosa, María, Lucía, Gabi, gracias por dar una mano siempre que se los he pedido. A los jefes, por supuesto: Jose, Javier León y Dolo por adoptarme prácticamente también como una becaria más del laboratorio.

A la gente del laboratorio del Dr. Hurlé, por hacerme otro huequito cuando lo necesité: Lolo, Nacho, Sonia, Juanan. ¡Gracias por el tiempo dedicado en enseñarme!

A Nieves y Susana del laboratorio de la Dra. Maruja Hurlé por dedicarme también su tiempo esos días que estuve allí aprendiendo algunas técnicas.

A todo el laboratorio de Matxalen, por la ayuda que me han brindado cuando más lo necesité... Gracias Matxalen, Anabel, Delfi, Coral, Elena y Esther. Aquí también me han acogido como una más del laboratorio.

Gracias a toda la gente del resto de los laboratorios de la facultad, ya que siempre que necesité algo no han dudado en ayudarme y con muchos de los cuales he compartido buenos ratos fuera de la universidad. Gracias María Castañeda, Vir, Verito, Ceci, Alejandro, Mapi, Mati, Inma, Raquel, Jorge, Lillo, Val, Begoña, Rocío, Ana Palanca, María Luisa, Antonio, Fuen, Rebeca, Sandra, Sandrita (y muchos más que me estaré olvidando de nombrar, pero no por eso menos importantes...).

Gracias Manolo por ser siempre tan atento y por tus charlas tan interesantes de meteorología e historia.

Gracias al personal del animalario, por alegrar mis interminables horas allí abajo y ayudarme siempre que lo he pedido. Gracias Miguel, Mar, Marta, Gregorio, Dani, Josefina, Clari, Patricia y Lourdes.

Gracias a toda mi nueva gente del IFIMAV. En primer lugar, gracias Miguel Ángel por esta oportunidad que me estás dando y por la paciencia que me has tenido en este último año. Gracias al resto de la gente del IFIMAV que me acompaña día a día, sacándome una sonrisa, principalmente a Raquel, Rodrigo, Sara, Lilian, Olga, Ana Fontalba, Ana I, Gonzalo, Inés, Ana Berja y Ma. José.

Muchas gracias a la gente del Laboratorio del Dr. Francisco Blanco Vaca, del Hospital Sant Pau (Barcelona), por su amable colaboración. Principalmente al Dr. Joan Carles Escolá-Gil, por su invaluable ayuda y sus interesantes comentarios sobre nuestros resultados.

No me olvido del grupo del Dr. Francisco Martín del GENYO (Granada), con quien tuve la oportunidad de hacer una estancia. Agradezco la cordialidad con la que me han tratado tanto él como su grupo, y todo lo que me han enseñado. Gracias Paco, Karim, Angélica, Per, Migue y Pili.

Gracias a las chicas de la Escuela de Enfermería: Chelo, María y María (Neurología), por haberme dado una mano siempre que han podido y por haberme recibido siempre con esa alegría que las caracteriza.

Gracias también Lu, David, Bruno y Mary por el apoyo que siempre me han dado.

Además quiero agradecer a Ronaldo, como así también a mi nueva familia de Santander, tanto a los que me acogieron inicialmente con mucho cariño: Antonio, Diego y Ana María, como a los que me han adoptado también ahora: Carmen y Javier, Pablo y Carmen.

Javi, gracias por tu paciencia infinita, el cariño brindado, tu apoyo incondicional y por no dejarme bajar los brazos a pesar del cansancio.

Papá, mamá y Juli, gracias por los valores que me han inculcado, de los cuales estoy muy orgullosa, y por no cortarme las alas nunca, dejándome cumplir mis sueños, incluso significando esto estar separados por miles de kilómetros. ¡Los quiero!

***"Haz de los obstáculos escalones para
aquello que quieres alcanzar"***

(Charles Chaplin)

ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
Introducción	1
1. Autoinmunidad. Mecanismos genéticos y ambientales.....	1
2. La artritis reumatoide como modelo de enfermedad autoinmune.....	2
2.1. El modelo experimental de artritis inducida por colágeno.....	4
3. La enfermedad cardiovascular.....	5
4. Riesgo de enfermedad cardiovascular en la artritis reumatoide.....	9
5. Subpoblaciones funcionales de células T involucradas en la artritis reumatoide y la aterosclerosis	10
6. Apolipoproteínas. Importancia de la ApoE en diferentes contextos.....	14
6.1. Modelo experimental de aterosclerosis.....	20
Objetivos.....	27
Material y métodos.....	33
1. Material biológico.....	33
1.1. Animales de experimentación.....	33
1.1.1. Estirpes de ratones	33
1.1.2. Mantenimiento y manipulación de los animales	33
2. Obtención de muestras biológicas	34
2.1. Suero	34
2.2. Suspensiones celulares	34
2.3. ADN genómico	35
2.4. ARN total a partir de órganos de ratón	35
3. Técnicas	35
3.1. Determinación del genotipo de los animales por PCR.....	35
3.2. Modelo experimental de artritis inducida por colágeno (AIC).....	37
3.2.1. Inducción de artritis.....	37
3.2.2. Valoración clínica.....	37
3.2.3. Valoración radiológica.....	37
3.2.4. Procesamiento para estudio histológico de las articulaciones.....	38
3.3. Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos anti-CII por ELISA.....	38
3.4. Estudio de las subpoblaciones celulares de los órganos linfoides.....	39
3.4.1. Caracterización de la subpoblación linfocitaria iTreg.....	39

3.4.2. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th17.....	40
3.5. Estudio de la expresión de citocinas por PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real.....	41
3.5.1. Retrotranscripción.....	41
3.5.2. Amplificación del ADNc por PCR cuantitativa a tiempo real.....	41
3.6. Estudio de las lesiones ateroscleróticas.....	42
3.7. Determinación del perfil lipídico de los ratones	42
3.7.1. Determinación del colesterol total, LDL/VLDL y HDL en suero.....	42
3.7.2. Determinación de los niveles de triglicéridos en suero.....	43
3.7.3. Aislamiento de lipoproteínas.....	43
3.7.4. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	43
3.7.5. Ensayos de oxidación en lipoproteínas: Monitorización de formación de dienos conjugados.....	44
3.8. Determinación de la concentración de ApoE en suero por ELISA	45
4. Análisis estadístico	45
Resultados	51
1. La ausencia de ApoE en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} aumenta la severidad de la AIC.....	51
2. El padecimiento de artritis en ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} no modifica su perfil lipídico.....	53
3. La ausencia de ApoE modifica el patrón de respuesta de anticuerpos anti-CII en los ratones inmunizados con CII.....	53
4. En los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} inmunizados con CII la expresión articular de citocinas pro-inflamatorias y la expansión de células Th1 y Th17 es mayor que en los B10.RIII.WT.....	54
5. El desarrollo de AIC en ratones no empeora la enfermedad aterosclerótica en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}	58
6. La presencia de un solo alelo de ApoE es suficiente para mantener un perfil lipídico normal	60
7. La severidad de la AIC en los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} es mayor que la de los ratones B10.RIII.WT	62
8. Las propiedades pro o anti-oxidantes de las partículas de HDL no intervienen en el agravamiento de la AIC en los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} respecto a los ratones WT	64
9. Efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el perfil lipídico y la evolución de la AIC.....	66

9.1. La administración de una dieta hipercolesterolémica sólo produce un ligero aumento en la colesterolemia en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE ^{+/+} , afectando severamente a los B10.RIII.ApoE ^{-/-}	66
9.2. La dieta hipercolesterolémica disminuye la severidad de la AIC en los ratones B10.RIII.WT y los B10.RIII.ApoE ^{+/+} , pero no en los B10.RIII.ApoE ^{-/-}	68
10. El efecto beneficioso de la dieta hipercolesterolémica en la AIC de los ratones B10.RIII.WT y B10.RII.ApoE ^{+/+} se correlaciona con un aumento en los niveles de ApoE circulantes.....	71
11. La administración de una dieta hipercolesterolémica modifica el patrón de respuesta de anticuerpos anti-CII en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE ^{+/+} inmunizados con CII	72
12. Los ratones B10.RIII.ApoE ^{+/+} y los B10.RIII.ApoE ^{-/-} muestran un aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias en las articulaciones, pero la dieta rica en colesterol no modula dicho patrón.....	74
Discusión	81
Conclusiones	103
Bibliografía	109
Anexo I:Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis	123
Anexo II: Otros trabajos publicados durante el período predoctoral	135

ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
AcM:	Anticuerpo monoclonal
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario
Ag:	Antígeno
AIC:	Artritis Inducida por Colágeno
AMP:	Adenosín monofosfato
Apo:	Apolipoproteína
APC:	Aloficocianina
AR:	Artritis reumatoide
ARN:	Ácido Ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
BBC:	Tampón bicarbonato-carbonato
BCR:	Receptor antigénico de los linfocitos B
BSA:	Albúmina sérica bovina
CETP:	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i> (proteína de transferencia de ésteres de colesterol)
CFA:	Adyuvante completo de Freund
CII:	Colágeno tipo II
CMV:	Citomegalovirus
CV:	Cardiovascular
DAB:	Di-amino bencidina
DAMP:	<i>Danger associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a peligro)
DEPC:	Dietil pirocarbonato

dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT:	Ditiotreitol
EBV:	Virus Epstein-Barr
EDTA:	Ácido etilen diamino tetraacético
EAE:	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i> (Encefalomiелitis experimental autoimmune)
ELISA:	Enzimo-inmunoensayo
FITC:	Fluoresceína isotiocianato
GAPDH:	Enzima Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GWAS:	Estudios de asociación del genoma completo
HC:	Dieta hipercolesterolémica
HDL:	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidad)
HLA:	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitario humano)
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano picante)
IFA:	Adyuvante incompleto de Freund
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.:	Intraperitoneal
iTreg:	Células T reguladoras inducidas
kDa:	Kilodaltons

LCAT:	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i> (lecitina-colesterol acetiltransferasa)
LDL:	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baja densidad)
LDLR:	Receptor de la lipoproteína de baja densidad
LES:	Lupus eritematoso sistémico
LPS:	Lipopolisacárido
LTi:	<i>Lymphoid tissue inducer cells</i> (células inductoras de tejido linfático)
LXR:	<i>Liver X Receptor</i> (Receptor hepático X)
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs:	Metaloproteinasas de matriz
NK:	<i>Natural killer</i> (Célula asesina natural)
NKT:	Célula T asesina natural
ns:	No significativo
NOS:	Óxido Nítrico Sintasa
nTreg:	Células T reguladoras naturales
PAF-AH:	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase</i> (factor activador de plaquetas acetilhidroxilasa)
PAMP:	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a patógenos)
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampón salino fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PE:	Ficoeritrina
PerCp:	Peridin-clorofila-proteína
PHA:	Fitohemaglutinina
p.i.:	Post-inmunización
PMA:	Forbol 12-miristato 14-acetato
PON1:	Paraoxonasa
PUFA:	Ácidos grasos poliinsaturados

qPCR:	PCR cuantitativa
RO:	Seno retroorbitario
rpm:	Revoluciones por minuto
SAA:	<i>Serum amiloid A protein</i> (proteína amiloide sérica A)
s.c.:	Subcutáneo
SD:	Desvío estándar
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
TA:	Temperatura ambiente
TBE:	Tampón Tris-borato-EDTA
TC:	<i>Total cholesterol</i> (colesterol total)
TCR:	Receptor antigénico de los linfocitos T
Tg:	Transgénico
TG:	Triglicéridos
TGF:	Factor de crecimiento tumoral
Th:	Linfocitos T-CD4 ⁺ colaboradores o <i>helper</i>
TLR:	Receptor <i>toll like</i>
TNF:	Factor de necrosis tumoral
Treg:	Células T reguladoras
U:	Unidades
UV:	Ultravioleta
VLDL:	<i>Very low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de muy baja densidad)
WT:	<i>Wild type</i> (Cepa Silvestre)

Introducción

1) AUTOINMUNIDAD. MECANISMOS GENÉTICOS Y AMBIENTALES.

La **autoinmunidad** se define como una respuesta inmune humoral y celular dirigida hacia antígenos propios, con la consecuente producción de autoanticuerpos y/o células T autorreactivas y la posterior infiltración patológica de linfocitos y macrófagos en los tejidos afectados. Las enfermedades autoinmunes afectan a aproximadamente el 5% de la población mundial, siendo más frecuentes en países desarrollados (*Goodnow 2007*).

Las enfermedades autoinmunes se clasifican en dos grupos, en función de que la reacción del sistema inmune se dirija específicamente contra los antígenos de un órgano concreto o de que no discrimine y lo haga de forma más o menos generalizada. En el primero de los casos hablamos de enfermedades autoinmunes “órgano-específicas”, mientras que en el segundo utilizamos la denominación de enfermedades autoinmunes “sistémicas”. Ejemplos de las primeras son la diabetes mellitus tipo I, la esclerosis múltiple, la tiroiditis de Hashimoto o la enfermedad de Graves-Basedow. Entre las formas clínicas más características de autoinmunidad sistémica se encuentran la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. En ellas se produce un ataque inmunológico a varios órganos, dado que los autoantígenos que centran este ataque tienen una amplia distribución a nivel sistémico (*Javierre, Esteller and Ballestar 2008*).

En los últimos años, gracias a la aplicación de nuevas tecnologías, como el genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), la secuenciación de genomas completos (GWAS) y los estudios en modelos animales (ya sea espontáneos o modificados por ingeniería genética), se han identificado muchos de los factores genéticos que hacen a los individuos más susceptibles al desarrollo de determinadas enfermedades autoinmunes. Diversas enfermedades autoinmunes se han asociado, hasta la actualidad, con cerca de 200 alteraciones en genes que participan en vías de señalización intracelular relevantes en la activación o el control del sistema inmunitario, incluyendo las rutas de señalización por receptores de citocinas, por los receptores para el antígeno en las células de la respuesta inmune adaptativa o por los receptores de señales de peligro en las células de la respuesta inmune innata (*Hewagama and Richardson 2009, Cho and Gregersen 2011*). Sin embargo, estudios realizados en gemelos idénticos muestran que estas alteraciones en la secuencia de los genes no son suficientes, por sí mismas, para generar autoinmunidad. Parece pues evidente que otros factores adicionales, probablemente de tipo ambiental, deben

concurrir para que un proceso autoinmune tenga lugar (Fraga et al. 2005, Alarcon-Riquelme 2007). Así, se ha demostrado que diversos factores ambientales son capaces de inducir cambios epigenéticos, los cuales podrían conducir a una modificación en la expresión génica en determinadas células, resultando en una pérdida de tolerancia hacia lo propio y, finalmente, en el desarrollo de autoinmunidad en aquellos individuos que estén predispuestos genéticamente. Los factores ambientales que se postula que pueden producir cambios epigenéticos son el humo del tabaco, numerosos agentes infecciosos predominantemente de tipo viral, la luz ultravioleta, compuestos químicos o el estrés, entre otros (Harley and James 2006, Klareskog et al. 2006, Maverakis et al. 2010, Wu and Li 2012, Harpaz et al. 2012).

Debido a la gran diversidad genética y ambiental existente en la población general, cada individuo responde de manera diferente a los estímulos, dependiendo de combinaciones individuales de factores genéticos y epigenéticos. Esto permite establecer umbrales de estímulo-respuesta, existiendo de esa manera una zona de respuesta fisiológica normal (Cho and Gregersen 2011) (**Figura 1**).

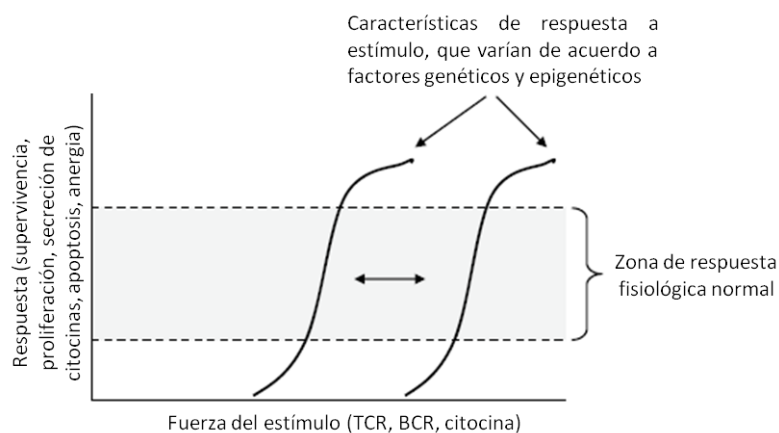


Figura 1: Umbrales de estímulo-respuesta. Modelo matemático que intenta demostrar que cada individuo responde de manera diferente a un determinado estímulo, dependiendo de su propia combinación de factores genéticos y epigenéticos (adaptado de Cho and Gregersen 2011).

2) LA ARTRITIS REUMATOIDE COMO MODELO DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE

La **artritis reumatoide (AR)** es una enfermedad de patogenia compleja que afecta al 0,5% de la población adulta a nivel mundial, y que tiene una mayor tasa de prevalencia en mujeres a partir de los 40 años de edad. Su incidencia es de 20-50 por cada 100.000 casos al año (*Carmona et al. 2010*). Esta enfermedad es común en el norte de Europa y Norteamérica, y aparece con menor frecuencia en otras regiones, como África oriental y Oceanía (*Kalla and Tikly 2003*).

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica y crónica que involucra hiperplasia del tejido sinovial y daño estructural del cartílago, hueso y ligamentos. La severidad de esta patología es muy amplia, causando diferentes grados de destrucción articular e implicación de tejidos y órganos extra-articulares (*Cho et al. 2007, Carmona et al. 2010*). Se sabe que los pacientes afectados por la artritis reumatoide padecen con mayor frecuencia, respecto a la población general, enfermedades cardiovasculares, infecciones, enfermedad pulmonar o renal y linfoma (*Michaud and Wolfe 2007*). De hecho, los pacientes con artritis reumatoide tienen una mayor tasa de mortalidad con respecto a la población general (con una reducción en la expectativa de vida de unos 3-10 años), siendo la principal causa de muerte las enfermedades cardiovasculares (*Carmona et al. 2010*).

La etiología de la artritis reumatoide es desconocida, si bien se ha sugerido que la pueden desencadenar factores genéticos, ambientales e infecciosos. Se han identificado varios genes que se relacionan con una mayor susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide, asociados principalmente con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), aunque ninguno de ellos es exclusivamente responsable de producirla (*Gregersen, Silver and Winchester 1987, Boissier et al. 2012*). La asociación del MHC II con la artritis reumatoide se atribuye en particular a polimorfismos en el gen HLA-DRB1, el cual codifica para una secuencia de aminoácidos común denominada **epítipo compartido** (*Stastny 1976*). Pero también se han descrito otras alteraciones genéticas fuera de la región MHC, dentro del conjunto de factores de riesgo para el desarrollo de la artritis reumatoide. Entre ellos se hallan las regiones asociadas con la fosfatasa PTPN22 (*Begovich et al. 2004*) y el factor de transcripción STAT4 (*Remmers et al. 2007*), los cuales también se han asociado con susceptibilidad al padecimiento de otras enfermedades autoinmunes (*Smyth et al. 2004, Skorka et al. 2005, Vandiedonck et al. 2006, Korman et al. 2008, Taylor et al. 2008*).

2.1) El modelo experimental de artritis inducida por colágeno

Como se ha dicho anteriormente, se desconoce la causa exacta de la AR, si bien han sido propuestos varios agentes como posibles antígenos de las respuestas de las células T patogénicas en esta enfermedad. Entre ellos se hallan el citomegalovirus (CMV), el virus Epstein-Barr (EBV), los proteoglicanos, y el colágeno de tipo II (*Brand, Kang and Rosloniec 2003*).

El colágeno tipo II (CII) es uno de los autoantígenos mejor establecidos en la patogenia de la artritis reumatoide humana, dado que se hallan altos niveles de autoanticuerpos anti-CII y células T específicas de CII, principalmente durante las fases tempranas de la enfermedad. El CII se localiza exclusivamente en el tejido cartilaginoso, como el que recubre las superficies óseas de las articulaciones diartrodiales. Esta asociación ha conducido al desarrollo del modelo animal de la **artritis inducida por colágeno (AIC)**. En este modelo experimental, la inmunización con CII heterólogo induce una potente respuesta autoinmune, acompañada por inflamación sinovial, destrucción articular y erosión ósea, con manifestaciones clínicas muy similares a la artritis reumatoide que se desarrolla en los humanos (*Cho et al. 2007*). Este modelo se ha desarrollado exitosamente en ratones, ratas y monos (*Wooley and Chapedelaine 1987, Durie, Fava and Noelle 1994, Holmdahl et al. 1989*). La AIC es el modelo que más se utiliza actualmente para estudiar la patogenia de la artritis autoinmune y para evaluar nuevas dianas terapéuticas en esta enfermedad y otros procesos similares (*Brand et al. 2003, Cho et al. 2007*).

La inmunización de ratones con CII emulsionado con adyuvante completo de Freund (CFA) induce una reacción inmunitaria que se organiza fundamentalmente en los nódulos linfáticos. En esta respuesta destaca la activación de las células dendríticas con producción de citocinas pro-inflamatorias y moléculas co-estimuladoras y activación de células T naïve. Esta activación de células dendríticas y células T induce a su vez la activación de células B naïve. Estas células B activadas producen anticuerpos anti-CII, principalmente de las subclases IgG_{2a} e IgG_{2b}, los cuales son capaces de activar la cascada del complemento e iniciar así una respuesta inflamatoria en las articulaciones. También se producen anticuerpos de la subclase IgG₁, aunque en menor cantidad con respecto a los de la subclase IgG₂, ya que la respuesta inmune generada es predominantemente de los tipos Th1 y Th17. A las 4-5 semanas de la inmunización ya se pueden observar signos clínicos de inflamación en las articulaciones, la cual puede persistir hasta la semana 12ª.

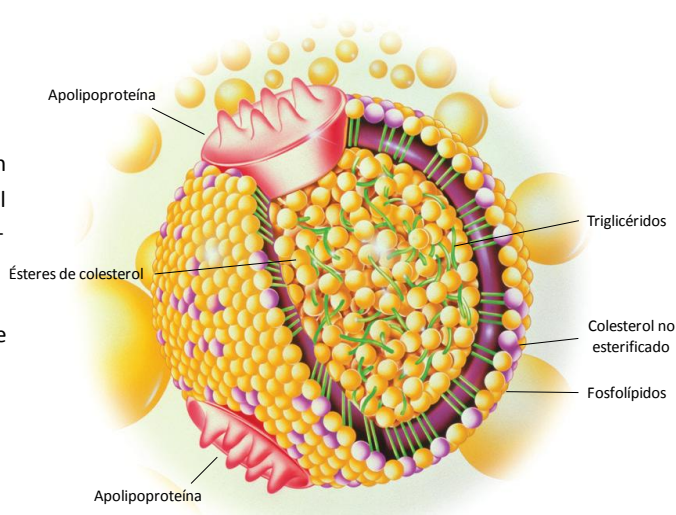
Esta reacción inflamatoria en las articulaciones conduce finalmente a una destrucción articular, a través de un trabajo conjunto entre las células del sistema inmune, incluidos los osteoclastos, y las moléculas efectoras (Cho *et al.* 2007). El resultado final de todo ello es frecuentemente la anquilosis articular.

Tal como sucede en muchas enfermedades autoinmunes humanas, la susceptibilidad a la AIC en ratones es dependiente del haplotipo MHC de la cepa de ratones utilizada y del origen del colágeno II empleado (Cho *et al.* 2007). De esta manera, las cepas de ratones portadoras del haplotipo H-2^q son susceptibles al desarrollo de artritis luego de la inmunización con CII humano, de pollo o bovino, pero no porcino, mientras que las cepas portadoras del haplotipo H-2^r sólo desarrollan artritis cuando son inmunizadas con CII bovino o porcino, pero no humano ni de pollo (Wooley *et al.* 1985). Las cepas de ratones portadoras del haplotipo H-2^b, en cambio, sólo desarrollan AIC cuando son inmunizadas con colágeno de pollo (Wooley *et al.* 1981). Este dato es de gran interés habida cuenta que la mayoría de ratones genéticamente manipulados portan este haplotipo en su MHC.

3) LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Dado que los lípidos son insolubles en agua, para ser transportados en el torrente sanguíneo necesitan asociarse a proteínas que les permitan hacerlo. Es por ello que existen varios tipos de **apolipoproteínas**, que se asocian con diferentes tipos de lípidos en distintos estadios de su metabolismo, y que en conjunto forman las denominadas **lipoproteínas**. De esta manera, las lipoproteínas poseen una superficie hidrofílica, compuesta por fosfolípidos, colesterol no esterificado y apolipoproteínas, mientras que su núcleo es hidrofóbico, con predominio de triglicéridos y ésteres de colesterol (Nelson and Cox 2007) (**Figura 2**).

Figura 2: Estructura de una lipoproteína, con una superficie polar compuesta por colesterol no esterificado, fosfolípidos y apolipoproteínas, y un centro hidrofóbico, constituido por colesterol no esterificado y triglicéridos (Imagen adaptada a partir de www.usb.affymetrix.com).



Existen varios tipos de lipoproteínas encargadas del transporte de los principales lípidos del organismo en diferentes direcciones. Estas lipoproteínas se clasifican en las siguientes clases, de acuerdo a su densidad (*Mahley et al. 1984, Charlton-Menys and Durrington 2007*):

- *Quilomicrones*: Son las partículas encargadas de absorber los triglicéridos y el colesterol de la dieta en el epitelio intestinal y de transportarlos al resto del organismo. Son partículas ricas en las apolipoproteínas ApoB-48, ApoE y ApoA-I.
- *Lipoproteínas de muy baja densidad (Very Low Density Lipoproteins, VLDL)*: Se encargan del transporte inicial de colesterol y triglicéridos sintetizados en el hígado hacia varios tejidos, y son ricas en ApoE y ApoB-100.
- *Lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins, LDL)*: Aportan la mayor parte del colesterol a las células del organismo. Son ricas en ApoB-100.
- *Lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoproteins, HDL)*: Son las encargadas de transportar el exceso de colesterol al hígado para su eliminación (transporte reverso de colesterol), y son ricas en las apolipoproteínas ApoA-I, ApoA-II y ApoE.

La pared arterial está compuesta de tres capas claramente diferenciadas: la íntima, la media, y la adventicia. La íntima es la capa más interna de la arteria, y está formada por una monocapa de células endoteliales unidas a una matriz extracelular. La media está compuesta principalmente por células de músculo liso, mientras que la adventicia contiene una mezcla de tejido conectivo, terminaciones nerviosas, fibroblastos y leucocitos residentes quiescentes (*Esteban et al. 2011*).

Las partículas de LDL circulan normalmente en el plasma sanguíneo. En la circulación, las partículas de LDL están protegidas de la oxidación por las partículas de HDL, las cuales cuentan con enzimas antioxidantes tales como la paraoxonasa (PON1), el factor activador de plaquetas acetilhidroxilasa (PAF-AH) y la lecitina-colesterol acetiltransferasa (LCAT) (*Podrez 2010*). En determinadas situaciones, como la inflamación, las células endoteliales se activan, expresando moléculas que permiten la adhesión de los leucocitos y las plaquetas activadas al endotelio y aumentando también la permeabilidad del mismo a componentes plasmáticos (*Zernecke and Weber 2010*). En el espacio subendotelial (íntima), las partículas de LDL son retenidas por interacción iónica de ApoB-100 con los

proteoglicanos de la matriz extracelular, donde son más susceptibles a sufrir modificaciones oxidativas por parte de especies reactivas de oxígeno o enzimas como la mieloperoxidasa o la lipooxigenasa (Weber and Noels 2011). Los cambios oxidativos se producen tanto en los lípidos como en las moléculas de apolipoproteína B que la componen. Las LDL oxidadas son reconocidas por receptores de la inmunidad innata (receptores *scavenger* y CD36), presentes en la superficie de macrófagos. Realmente el sistema inmune las percibe como una señal de peligro (*danger associated molecular pattern*, DAMP) lo cual conlleva un elevado efecto pro-inflamatorio, promoviendo el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T al sitio de lesión en la pared arterial. De esta manera, los macrófagos comienzan a acumular ésteres de colesterol en su interior, convirtiéndose en **células esponjosas o espumosas**, las cuales forman estrías grasas y evolucionan con el tiempo a placas ateroscleróticas (Matsuura et al. 2006). La LDL oxidada estimula además la expresión de moléculas de adhesión y citocinas pro-inflamatorias y es, por otra parte, altamente inmunogénica (Matsuura et al. 2009). Todos estos sucesos perpetúan el ciclo de la inflamación en la pared arterial, siendo éste uno de los primeros pasos en la progresión de la placa aterosclerótica (**Figura 3**).

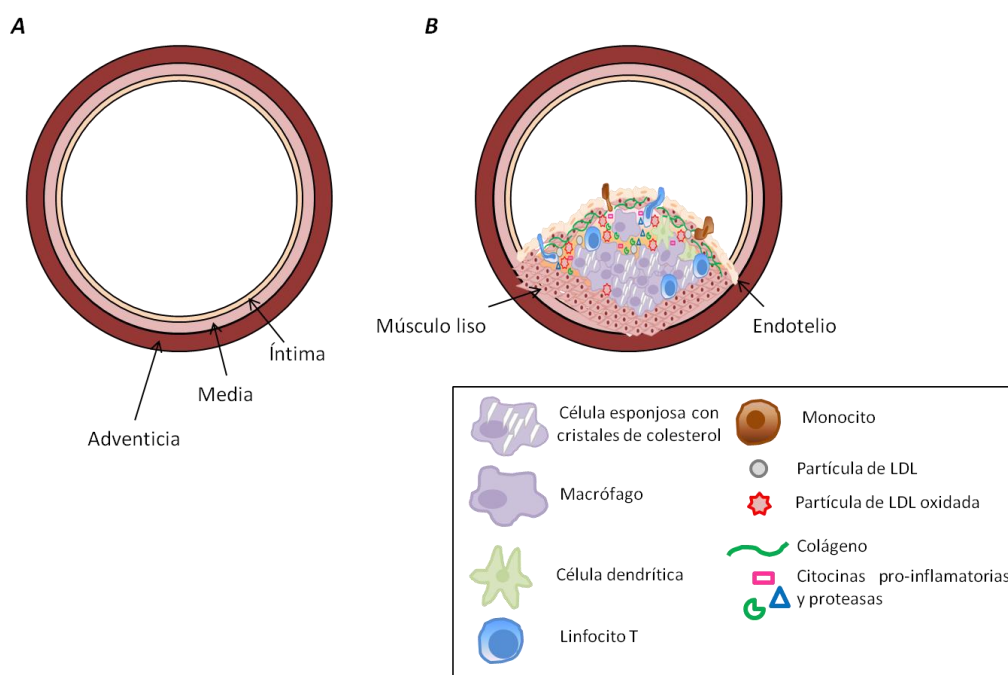


Figura 3: A) Capas que componen la pared de una arteria sana. B) Componentes inmunológicos de una lesión aterosclerótica, con infiltración de linfocitos T y monocitos a través del endotelio.

A medida que la lesión progresa, se observa una proliferación de células de músculo liso, una acumulación de células esponjosas, cristales de colesterol, material necrótico y apoptótico, infiltración de células T, células dendríticas y macrófagos. Todo ello va engrosando progresivamente la íntima y estrechando la luz del vaso sanguíneo, a la vez que disminuye la elasticidad de la pared arterial. A su vez, sobre la placa aterosclerótica se comienza a depositar una capa de colágeno (capa fibrosa), la cual por acción de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y las citocinas pro-inflamatorias puede llegar romper la barrera endotelial generando un trombo plaquetario que impide la circulación sanguínea de forma aguda, causando un fenómeno isquémico en el tejido irrigado por esa arteria (*Zernecke and Weber 2010*) (**Figura 3**).

Los vasos sanguíneos más comúnmente afectados por este proceso son la aorta, las arterias coronarias, la carótida y las arterias cerebrales. A todo este proceso inflamatorio crónico en la pared de los vasos sanguíneos, donde intervienen tanto células de la respuesta inmune innata como adaptativa, se le denomina **aterosclerosis** (*Matsuura et al. 2006*).

Un hecho importante a destacar es que los niveles de HDL se correlacionan negativamente con el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares. Si bien inicialmente se creía que el papel de HDL estaba limitado exclusivamente al transporte reverso del colesterol, actualmente se sabe que esta lipoproteína cumple varias funciones más. Es también una partícula anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-trombótica, ya que modula la expresión de citocinas y el reclutamiento y/o la adhesión de monocitos a la pared arterial (*Cockerill et al. 1995, Graham et al. 1997, Movva and Rader 2008, Podrez 2010*). Sin embargo, en un estado inflamatorio sistémico agudo o crónico, las partículas de HDL pueden volverse disfuncionales y pro-inflamatorias, siendo incapaces de proteger a la LDL de la oxidación, causando inflamación de la pared arterial y favoreciendo la progresión de la lesión aterosclerótica (*Charles-Schoeman et al. 2008, Podrez 2010*). Este cambio en las propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes de las HDL se debe a que, a consecuencia de la inflamación, las moléculas de ApoA-I que componen las HDL son reemplazadas por la proteína amiloide sérica A o SAA (proteína de fase aguda), y disminuye también la actividad de las enzimas anti-oxidantes PON1 y PAF-AH, entre otras modificaciones (*Van Lenten et al. 2001, Ansell et al. 2005*).

4) RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

Como se ha dicho anteriormente, cerca de un 40% de los fallecimientos en los pacientes con artritis reumatoide se deben a eventos cardiovasculares, ocurriendo éstos a una edad más temprana que en la población general (*Meune et al. 2009*). Se sabe que el mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (CV) en estos pacientes se debe a la mayor prevalencia de aterosclerosis y sus complicaciones (*Gonzalez-Gay, Gonzalez-Juanatey and Martin 2005*). Existen factores de riesgo CV tradicionales, los cuales suelen tener un papel importante en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, incrementando el riesgo de enfermedad CV en la artritis reumatoide (*Ku et al. 2009*). Entre ellos hay factores que no se pueden modificar, como son la edad (a mayor edad, mayor riesgo de evento CV), las hormonas sexuales (el riesgo en mujeres aumenta después de la menopausia), el género y los antecedentes familiares genéticos. Entre los factores de riesgo CV tradicionales sobre los que el paciente tiene posibilidad de influir se encuentran la hiperlipidemia, la hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes mellitus, la obesidad y la vida sedentaria (*Jousilahti et al. 1999*). Sin embargo, estos factores de riesgo CV tradicionales no son capaces de explicar en su totalidad la mayor incidencia de este tipo de eventos en los pacientes afectados con artritis reumatoide, lo cual sugiere que deben existir otros mecanismos que aumenten el riesgo de accidentes vasculares en estos pacientes (*Bartoloni et al. 2010*).

El principal nexo de unión entre la artritis reumatoide y la mayor prevalencia de aterosclerosis es el estado inflamatorio crónico que subyace en ambas patologías. En la artritis reumatoide, como enfermedad sistémica que es, existe un ambiente inflamatorio generalizado, que afecta desde las primeras fases de la enfermedad a las articulaciones. Como consecuencia de ello, se liberan a la circulación sistémica factores pro-inflamatorios tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esto, localmente conduce a una destrucción articular, afectando tejidos y órganos distantes, entre ellos el endotelio vascular. En este contexto se favorece un estado pro-aterogénico, caracterizado por anomalías en el perfil lipídico, disfunción endotelial, resistencia a la insulina, dislipidemia y un estado pro-oxidativo (*Dessein, Stanwix and Joffe 2002, Vaudo et al. 2004, Gonzalez-Gay et al. 2005, Pieringer and Pichler 2011*). Recientemente, González-Juanatey y colaboradores observaron un aumento en la disfunción endotelial y en el espesor íntima-media de las arterias carótidas en pacientes con artritis reumatoide, aun en fases clínicas donde no existe todavía evidencia de

enfermedad cardiovascular e, inclusive, en ausencia de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Esta asociación se observa de forma constante en pacientes que padecen la enfermedad desde hace muchos años (*Gonzalez-Juanatey, Llorca and Gonzalez-Gay 2011*). Todo esto apoya la hipótesis de que el estado inflamatorio sistémico presente en los cuadros de artritis reumatoide es un factor de riesgo cardiovascular independiente de los factores ya conocidos.

Es sabido además que los niveles elevados de colesterol total, triglicéridos y LDL, y bajos niveles de HDL se asocian con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (*Nurmohamed 2009*). Se ha demostrado que tales perfiles lipídicos desfavorables existen en la sangre de pacientes con artritis reumatoide, inclusive 10 años antes de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (*van Halm et al. 2007*). Es importante destacar que el tratamiento de la artritis reumatoide con agentes biológicos u otros tratamientos aumenta los niveles de colesterol total y de HDL, pero sin incrementar el índice aterogénico TC/HDL (*Pieringer and Pichler 2011*). Varios autores demuestran además que los pacientes con artritis reumatoide tienen niveles elevados tanto de LDL oxidada como de auto-anticuerpos anti-LDL modificada por oxidación (*Dai et al. 2000, Cvetkovic et al. 2002, Kim et al. 2004*). Por último, corroborando la hipótesis de la HDL disfuncional en situaciones de inflamación sistémica, McMahon y colaboradores hallaron que en un 20,1% de las mujeres que padecían artritis reumatoide predominaba la forma pro-inflamatoria de HDL (a pesar de tener niveles normales de HDL total), en comparación con un 4,1% de las mujeres sanas que tenían predominio de estas HDL pro-inflamatorias (*McMahon et al. 2006*).

5) SUBPOBLACIONES FUNCIONALES DE CÉLULAS T INVOLUCRADAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE Y LA ATEROSCLEROSIS

Dependiendo de la combinación de citocinas que se produce durante su interacción inicial con un determinado antígeno, las células T CD4⁺ naïve se diferencian a diferentes tipos de células T efectoras: Th1, Th2 y Th17. Estas células diferenciadas no sólo son por sí mismas capaces de eliminar las células infectadas, sino que a su vez se combinan con otras células efectoras del sistema inmune innato y adaptativo, amplificando la respuesta inmune. De esa manera, la combinación de mecanismos de la respuesta inmune

innata y adaptativa conducen finalmente a una eliminación eficaz del antígeno (*Littman and Rudensky 2010*).

Las respuestas del tipo **Th1** (inmunidad celular), se desencadenan en presencia de IFN γ e IL-12, e involucran componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa. En ella participan células NK activadas y macrófagos con un fenotipo de activación clásico (pro-inflamatorio). Estos macrófagos pro-inflamatorios producen radicales libres de oxígeno y óxido nítrico, derivado de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), e inducen la expresión de moléculas MHC de clase II. Por otra parte, intervienen también células T CD8⁺ citotóxicas, células Th1 productoras de IL-2, IL-12, IFN γ y TNF α , y células B productoras de anticuerpos IgG (principalmente del tipo IgG_{2a}) capaces de activar el complemento. El principal factor de transcripción involucrado en la diferenciación de las células Th1 es el denominado T-bet (*Zhu and Paul 2008, Taleb, Tedgui and Mallat 2010, Matzinger and Kamala 2011*). Este tipo de respuesta inmune se utiliza normalmente para eliminar patógenos intracelulares y virus, pero se encuentra exacerbada en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (*Ku et al. 2009*), la diabetes mellitus insulino-dependiente (*Wang et al. 1997, Joseph et al. 2012*) y en enfermedades inflamatorias crónicas como la aterosclerosis, teniendo en este último caso un efecto pro-aterogénico (*Taleb et al. 2010*). Sin embargo, en las últimas décadas el papel patogénico de las células Th1 en la AR se ha puesto en tela de juicio como consecuencia de los resultados obtenidos en experimentos utilizando ratones deficientes en IFN γ o el receptor de IFN γ . De esta manera, se ha observado que la deficiencia en IFN γ promueve el desarrollo de AIC en estirpes de ratones no susceptibles, como los ratones C57BL/6 (*Guedez et al. 2001, Chu et al. 2003*). Otros grupos han observado también que los ratones DBA/1 que carecen del receptor de IFN γ desarrollan una AIC más acelerada y severa con respecto a los ratones control, lo cual sugiere que el IFN γ tiene una función protectora en la AIC (*Manoury-Schwartz et al. 1997, Vermeire et al. 1997*).

Las respuestas del tipo **Th2** (inmunidad humoral), en cambio, se generan en respuesta a parásitos extracelulares. Este patrón de respuesta involucra eosinófilos y macrófagos con un fenotipo de activación alternativo (anti-inflamatorio), que inducen un aumento en la actividad de la enzima arginasa, reduciendo la producción de óxido nítrico. Este fenómeno aumenta la capacidad de endocitosis y fagocitosis de estas células, pero reduce su motilidad y los efectos citotóxicos. En la respuesta Th2 participan también los propios linfocitos Th2, productores de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, y las células B que producen

IgE e IgG₁. Los anticuerpos IgE se unen a los receptores FcεRI que se hallan sobre la superficie de basófilos y mastocitos, lo cual induce la secreción por parte de estas células de histamina, serotonina, IL-4, IL-13 y TNFα. Como consecuencia, se contrae el músculo liso, aumenta la permeabilidad vascular y se reclutan células inflamatorias (*Larche, Akdis and Valenta 2006*). En este caso el factor de transcripción encargado de la diferenciación de las células T CD4⁺ naïve a la subpoblación Th2 es GATA-3 (*Zhu and Paul 2008, Baitsch et al. 2011, Matzinger and Kamala 2011*). Las respuestas del tipo Th2 tienen un papel muy importante en la inmunidad asociada a mucosas. La activación anormal de las células Th2 se ha descrito en enfermedades inflamatorias como alergia y asma (*Murphy and Reiner 2002*). Se cree que las respuestas del tipo Th2 son ateroprotectoras, si bien su papel exacto aún es controvertido, pudiendo depender de varios factores, como el estadio y el sitio de lesión, el modelo experimental, etc (*Zhu and Paul 2008, Taleb et al. 2010*).

En los últimos años, estudios realizados en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes, como la AIC y la encefalomiелitis experimental inducida (EAE), han aportado evidencias que sugerían la existencia de otras subpoblaciones funcionales de células T CD4⁺, poniendo en jaque el paradigma que Th1/Th2, utilizado hasta el momento para explicar la patogénesis de diversas enfermedades. Tanto en el caso de la AIC como en el de la EAE, la enfermedad era más severa en ausencia de citocinas, receptores y factores de transcripción involucrados en respuestas de tipo Th1 (incluyendo el IFNγ y su receptor, la subunidad p35 de la IL-12, T-bet, entre otros) (*Ferber et al. 1996, Manoury-Schwartz et al. 1997, Vermeire et al. 1997, Gran et al. 2002, Zhang et al. 2003*). Sin embargo, a través de la utilización de ratones deficientes en la subunidad p35 de la IL-12 o la subunidad p19 de la IL-23, se ha demostrado que la IL-23 promueve la inflamación tardía (necesaria, a su vez, para mantener el estado inflamatorio crónico) en los modelos de AIC y EAE, mientras que la IL-12 protege de dicha inflamación (*Cua et al. 2003, Murphy et al. 2003*). Por su parte, Murphy y colaboradores describieron una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ productora de IL-17 en los ratones deficientes en IL-12, ausente en los ratones deficientes en IL-23 (*Murphy et al. 2003*). Esto condujo a la identificación de otra subpoblación funcional de células T CD4⁺ a las que se denominó células **Th17** (*Harrington et al. 2005, Park et al. 2005*). Este nuevo linaje es capaz de producir IL-17 (IL-17A), IL-17F, IL-21 e IL-22. Si bien las células encargadas de secretar estas citocinas son principalmente las Th17, también contribuyen las células Tγδ y las LTis, entre otras (*Taleb et al. 2010*). Los factores de transcripción responsables de la diferenciación a este linaje incluyen RORγt, ROR-α y STAT3. Para que se

produzca la diferenciación funcional a Th17, es necesaria la presencia de TGF β e IL-6. Una vez diferenciadas, se requiere IL-23 para expandir y estabilizar dicho linaje (Taleb *et al.* 2010). La IL-17A secretada por las células Th17 potencia la respuesta inflamatoria induciendo la producción de otras citocinas y quimiocinas, e interactuando con otras citocinas pro-inflamatorias. Este tipo de respuesta se halla involucrada en la defensa contra bacterias extracelulares y hongos (Zhu and Paul 2008, Matzinger and Kamala 2011). En la última década han surgido numerosas publicaciones donde se destaca la importancia de las células Th17 en enfermedades inflamatorias (Littman and Rudensky 2010), entre las que se incluyen la aterosclerosis (Xie *et al.* 2010, Smith *et al.* 2010), la esclerosis sistémica o esclerodermia (Kurasawa *et al.* 2000) y la esclerosis múltiple (Aranami and Yamamura 2008). En lo que respecta a la artritis reumatoide, ya en el año 2004 Lubberts y colaboradores demostraron que el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17 redujo la severidad de la AIC luego de inducir la enfermedad (Lubberts *et al.* 2004). También Sato y colaboradores identificaron a las células Th17 como una subpoblación crítica para el desarrollo de la AIC, no sólo en la fase de inicio, sino también en la fase de destrucción ósea (Sato *et al.* 2006).

Estos tres tipos de respuestas inmunes deben estar controladas, para así ser capaces de eliminar patógenos mientras se mantiene la tolerancia frente a autoantígenos y la flora microbiana habitual de nuestro cuerpo. Con este fin existen mecanismos de tolerancia central y periférica. A través de la tolerancia central se induce la apoptosis de células autorreactivas en timo y médula ósea. Los mecanismos de tolerancia periférica se desarrollan en órganos linfoides periféricos y otros tejidos, y dependen principalmente de la actividad de las células T reguladoras (**Treg**) (Littman and Rudensky 2010). Existen distintos tipos de células Treg, que se clasifican según el tipo de moléculas que expresan y por las citocinas que secretan. Las mejor caracterizadas son las que expresan Foxp3, un factor de transcripción que regula su capacidad supresora, y que representan un 5-10% de las células T CD4⁺ periféricas. Éstas a su vez se clasifican en Treg naturales (nTreg) y Treg inducidas (iTreg) (Gotsman, Sharpe and Lichtman 2008). Las células nTreg se desarrollan en el timo, donde adquieren su fenotipo supresor, y posteriormente migran a la periferia. La mayoría de las células nTreg expresan CD25 (la cadena α del receptor de la IL-2) de manera constitutiva y dependen del factor de transcripción Foxp3 para su desarrollo y función. Las células iTreg, en cambio, se generan en la periferia, durante una respuesta inmune activa, en presencia de TGF β e IL-2 (Wan and Flavell 2006). Estas células también expresan Foxp3 y su generación se ve favorecida en situaciones de inflamación crónica (Curotto de Lafaille *et al.*

2008), cuando se produce una exposición continuada de bajas dosis de antígeno (*Apostolou and von Boehmer 2004*), y en ausencia de co-estimulación (*Kretschmer et al. 2005*). Ambos tipos de Treg tienen un papel ateroprotector, ya sea por un efecto directo de estas células sobre las células T efectoras, o a través de su efecto sobre las células presentadoras de antígeno (*Taleb et al. 2010*). La función de las células T reguladoras parece estar disminuida durante los brotes de la artritis reumatoide. De hecho, los tratamientos para esta enfermedad con antagonistas del TNF α pueden inclusive restituir la función de esta subpoblación linfocitaria (*Nadkarni, Mauri and Ehrenstein 2007, Boissier et al. 2012*).

6) APOLIPOPROTEÍNAS. IMPORTANCIA DE LA ApoE EN DIFERENTES CONTEXTOS

Las apolipoproteínas tienen varias funciones:

- Transportan y redistribuyen los lípidos entre los tejidos del cuerpo. Esta función la realizan a través del reconocimiento de receptores presentes en las membranas celulares. Es sabido que las moléculas de ApoB-100 y ApoE son reconocidas por receptores hepáticos y extra-hepáticos, y que permiten de esa manera el transporte de diferentes lipoproteínas al interior de las células (*Go and Mani 2012*).
- Actúan como cofactores de enzimas del metabolismo lipídico. Este es el caso de la apolipoproteína A-I, la cual actúa de co-factor (activador) de la enzima LCAT (*Roosbeek et al. 2001*).
- Mantienen la estructura de las lipoproteínas. Se ha sugerido que ApoB, ApoA-I y ApoE estabilizan la estructura micelar de las lipoproteínas, formando una superficie hidrofílica junto con los fosfolípidos (*Lund-Katz and Phillips 2010, Kumar et al. 2011*).

Si bien todas las apolipoproteínas tienen una función importante, en las últimas décadas las investigaciones se han centrado principalmente en el estudio de una de ellas, la **apolipoproteína E (ApoE)**.

La ApoE fue descrita por primera vez en 1973 por Shore y Shore, como un componente de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) (*Shore and Shore 1973*), y se le ha adjudicado desde entonces el papel de transportar lípidos en asociación a las diferentes lipoproteínas plasmáticas nombradas anteriormente (*Greenow, Pearce and Ramji*

2005). El principal sitio de síntesis de ApoE es el hígado, aunque también se produce en otros tejidos como cerebro, glándula adrenal, bazo, pulmón, ovarios, riñones y músculo. Se estima que un 20-40% de las moléculas de ApoE en circulación provienen de la síntesis de tejidos extra-hepáticos (Greenow et al. 2005, Zhang, Wu and Wu 2011).

El gen que codifica la ApoE se ubica en posición 5' dentro de un grupo de genes que incluye la apolipoproteína C-I, la apolipoproteína C-II y la apolipoproteína C-IV (Greenow et al. 2005). El gen de ApoE es polimórfico en humanos, existiendo tres isoformas: *apoE2*, *apoE3* y *apoE4*. En roedores, sin embargo, sólo existe una única isoforma de ApoE, y que se asemeja a *apoE3* humana (Zhang, Wu and Zhu 2010). Los polimorfismos genéticos de ApoE afectan tanto a su conformación como a su unión a lipoproteínas y receptores celulares (Zhang et al. 2011). El gen de ApoE posee dos *enhancers*, HCR.1 y HCR.2, que se hallan en posición 3' con respecto al gen, y que dirigen la expresión de ApoE en hígado (Allan, Taylor and Taylor 1997). También se han identificado dos secuencias distales en posición 5', ME.1 y ME.2, los cuales modulan la transcripción de ApoE en adipocitos y macrófagos (Shih et al. 2000).

La expresión de ApoE es muy compleja, ya que es regulada de manera específica en los diferentes tejidos y en respuesta a cambios celulares y factores extra- e intracelulares. Existen factores que aumentan la transcripción de ApoE en macrófagos, como la diferenciación, la exposición a citocinas (como por ejemplo TGF β), hormonas, aumentos en los niveles de colesterol, y factores de transcripción tales como AP-1, NF κ B, y PPAR- γ (Greenow et al. 2005, Kockx, Jessup and Kritharides 2008). Las moléculas de LPS, en cambio, disminuyen la expresión de ApoE (Gafencu et al. 2007). Se ha descrito también que el receptor nuclear hepático LXR es capaz de regular la expresión de ApoE inducida por lípidos en adipocitos y macrófagos. Esto se debe a que existen elementos de respuesta a LXR en las secuencias distales ME.1 y ME.2 (Laffitte et al. 2001). Por otra parte, existen factores capaces de regular la secreción de ApoE, de manera independiente de la transcripción de la proteína. Entre ellos se encuentran las lipoproteínas LDL y HDL, las apolipoproteínas A-I, A-II, A-IV y la misma ApoE (Kockx et al. 2008).

La proteína de ApoE sigue la vía de secreción clásica, siendo sintetizada en el retículo endoplasmático y transportada luego al aparato de Golgi, donde se le agregan cadenas de carbohidrato conteniendo ácido siálico. Una vez realizadas estas modificaciones post-traduccionales, ApoE es incorporada dentro de vesículas, para luego

ser transportada a la membrana plasmática, donde es secretada. Pero no todas las moléculas de ApoE son liberadas al medio extracelular, sino que una parte de éstas se mantienen unidas a la superficie celular, a través de la asociación con proteoglicanos. Las moléculas de ApoE que se encuentran unidas a la superficie pueden ser luego re-internalizadas para su degradación o su posterior reciclaje a la superficie celular, o liberadas al medio extracelular (*Greenow et al. 2005, Kockx et al. 2008*). La molécula de ApoE resultante es una proteína de 299 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 34 kDa (*Zhang et al. 2011*).

ApoE actúa a través de la unión a receptores de membrana, pertenecientes a la familia del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Entre ellos se hallan: LDLR, VLDLR, apoER2, LRP1, megalina (o LRP2), LRP1B, y otros (*Zhang et al. 2011*). Se cree que ApoE actúa sobre múltiples vías de señalización, entre ellas la que involucra a NFκB (*Ophir et al. 2005*) y la de las MAPK (*Maezawa et al. 2006*).

Una gran fuente de ApoE son los macrófagos, los cuales sintetizan ApoE y la liberan a la circulación. En el fluido extracelular, ApoE forma complejos con las partículas de HDL e interviene en la eliminación del exceso de colesterol por la vía hepática, principalmente a través del receptor LDLR (*Li, Thompson and Kitchens 2008*). Pero, además de su papel en el transporte reverso de colesterol, estas moléculas de ApoE sintetizadas por los macrófagos podrían tener una actividad inmunomoduladora sobre dichas células, modificando su estado de activación a un fenotipo clásico o alternativo (*Baitsch et al. 2011*). Tenger y colaboradores sugieren que la ApoE secretada por los macrófagos impide la activación de las células T inhibiendo la expresión de las moléculas MHC II y moléculas co-estimuladoras (CD40 y CD80) sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (*Tenger and Zhou 2003*). Baitsch y colaboradores también sugieren que ApoE actúa como una molécula anti-inflamatoria, a través de la interacción con los receptores de superficie VLDLR y apoER2, induciendo un cambio en el fenotipo de los macrófagos desde pro-inflamatorio (expresión de MHC II, generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, producción de citocinas pro-inflamatorias) a anti-inflamatorio. Además es importante destacar que este efecto es específico de ApoE, ya que la apolipoproteína AI (también presente en HDL), fue incapaz de modificar el fenotipo de los macrófagos (*Baitsch et al. 2011*).

Este papel de ApoE como molécula inmunomoduladora ya había sido sugerido a finales de la década de 1970 y principios de 1980, cuando varios grupos describieron un

receptor que se hallaba sobre la superficie de los linfocitos y que era capaz de unirse a ApoE (Curtiss and Edgington 1978, Hui and Harmony 1980). Dicho receptor era capaz de inhibir la activación *in vitro* de linfocitos inducida por el mitógeno fitohemaglutinina (PHA), inhibiendo la acumulación de calcio intracelular y la síntesis de ADN (Mahley *et al.* 1984). Esta inhibición en la activación y proliferación de los linfocitos T se veía reflejada también en una disminución en la expresión de IL-2 (Kelly *et al.* 1994), por lo cual los linfocitos quedaban detenidos en la transición entre los estadios G1A y G1B del ciclo celular (Mistry *et al.* 1995). Laskowitz demostró en el año 2000 que ApoE, a concentraciones fisiológicas, inhibía la proliferación linfocitaria *in vitro* inducida por estimulación directa del receptor de las células T con anti-CD3, por estimulación no específica con PHA, y por estimulación antígeno-específica con toxoide tetánico. En vista de estos resultados, Laskowitz sugirió que era poco probable que ApoE actuase neutralizando el mitógeno, sino que sería más razonable que estuviera modulando la función inmune a través de un receptor específico sobre la superficie celular (Laskowitz *et al.* 2000). En 2005, Ali y colaboradores demostraron que ApoE suprimía las respuestas inmunes del tipo Th1, modulando la producción de IL-12 a través de TLR-3 y TLR-4 (Ali *et al.* 2005).

Existen también evidencias que vinculan a ApoE con elementos de la respuesta inmune innata, reforzando la hipótesis de que tiene una función inmunomoduladora. En 1991 se sugirió que ApoE era capaz de inhibir la estimulación de neutrófilos por cristales de urato en las articulaciones de los pacientes que padecen gota, a través de la unión a dichos cristales (Terkeltaub *et al.* 1991). Unos años después, Roselaar y colaboradores demostraron que los ratones deficientes en ApoE desarrollaban una respuesta inmune defectuosa frente a *Listeria monocytogenes*, presentando una mayor severidad de la infección y un menor índice de supervivencia respecto a los controles (Roselaar and Daugherty 1998). Por otra parte, se ha puesto en evidencia que ApoE disminuye los niveles de citocinas pro-inflamatorias inducidas por lipopolisacárido (LPS), reduciendo de esta manera su efecto letal (Van Oosten *et al.* 2001).

Pero las funciones de ApoE no sólo se limitan a modular respuestas inmunes y participar en el metabolismo de lípidos. La apolipoproteína E tiene además una importante función ateroprotectora, que es independiente de su efecto sobre el metabolismo de lípidos. En 1997, Fazio y colaboradores realizaron experimentos de trasplante de médula ósea en ratones WT, utilizando como donantes ratones WT o deficientes en ApoE.

Observaron que cuando se reconstituía la expresión de ApoE por trasplante de médula ósea de ratones WT, y posteriormente se administraba una dieta aterogénica durante 13 semanas, las lesiones ateroscleróticas eran menos severas que en aquellos ratones que habían recibido la médula ósea de ratones deficientes en ApoE, sin verse afectados los niveles de lipoproteínas plasmáticas o colesterol (*Fazio et al. 1997*). Este efecto ateroprotector de ApoE se debe a que esta apolipoproteína ejerce funciones antioxidantes, inhibe la proliferación y migración celular, inhibe la agregación plaquetaria y tiene funciones anti-inflamatorias.

Son numerosas las evidencias que demuestran la función ateroprotectora de ApoE. Se ha sugerido que ApoE podría actuar como un inhibidor de la oxidación de las moléculas de LDL, posiblemente a través de la unión a iones de metal, como el cobre y el hierro, evitando de esa manera su participación en el proceso oxidativo (*Miyata and Smith 1996, Pham, Kodvawala and Hui 2005*). Por otra parte, ApoE inhibe la proliferación de las células del músculo liso a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa, como así también la migración de estas células por un mecanismo en el cual interviene la protein-kinasa A dependiente de AMP cíclico (*Zhu and Hui 2003, Getz and Reardon 2009*). Se ha sugerido también que las moléculas de ApoE secretadas por los macrófagos y retenidas en la superficie celular por interacción con los proteoglicanos pericelulares modulan la disponibilidad de citocinas y factores de crecimiento que pueden actuar sobre las células endoteliales, siendo capaces de inhibir su proliferación (*Vogel et al. 1994*). Riddell y colaboradores postulan que ApoE inhibe la agregación plaquetaria a través de la interacción con el receptor apoER2. Esto pone en marcha una cascada de señalización que conduce finalmente a una activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (*Riddell, Graham and Owen 1997*). También se ha demostrado que ApoE promueve la maduración de las partículas de HDL, actuando como co-factor de enzimas que intervienen en dicho proceso. Entre ellas se hallan LCAT, CETP y la lipasa hepática (*Getz and Reardon 2009*). Por último, en el año 2003 se demostró que la inyección en ratones por vía intravenosa de un pequeño péptido mimético de ApoE disminuyó la respuesta inflamatoria sistémica y local en el cerebro de los animales en los que se había administrado LPS (*Lynch et al. 2003*). Más específicamente, el péptido mimético inhibió la liberación de TNF α e IL-6 inducida por LPS. Esto apoya el papel de ApoE como molécula anti-inflamatoria.

Otra función que se ha adjudicado a ApoE es la participación en la presentación de antígenos lipídicos. Este tipo de antígenos son presentados a un tipo especial de células T, con marcadores característicos de células *natural killer* (**células NKT**), a través de CD1, una molécula no polimórfica estructuralmente parecida a las moléculas MHC de clase I. Las células NKT se localizan fundamentalmente en timo, hígado, médula ósea y órganos linfoides periféricos (*Singh et al. 2001*). Estas células NKT responden tanto a antígenos lipídicos derivados de bacterias exógenas, como a lípidos endógenos presentados por células presentadoras de antígeno, activando mecanismos inmunológicos tanto de tipo innato como adaptativo. Se ha sugerido que las células dendríticas y las células B utilizan el receptor de LDL para captar las moléculas de ApoE que se hallan unidas a antígenos lipídicos (ya sea en forma de VLDL o como apolipoproteínas libres, sin asociarse en complejos lipoproteicos), endocitarlas y posteriormente presentar dichos antígenos a las células NKT (*Allan et al. 2009*). Al reconocer el antígeno lipídico, las células NKT secretan grandes cantidades de IFN γ e IL-4 (*Zhang et al. 2010*). Esta presentación de lípidos mediada por CD1 ha sido implicada en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (*Fazekas et al. 2001, Teige et al. 2004*).

Tal como se muestra en la **figura 4**, ApoE ejerce múltiples funciones ateroprotectoras. Como consecuencia, ApoE está involucrada en patologías relacionadas con el metabolismo lipídico. Sin embargo, también ha sido implicada en la enfermedad de Alzheimer (*Kim, Basak and Holtzman 2009*), la esclerosis múltiple (*Shi et al. 2008*) y la psoriasis (*Coto-Segura et al. 2010*). En la mayoría de los casos, la presencia del polimorfismo *apoE4* se asocia con un mayor riesgo de enfermedad (*Gaidukov et al. 2010*). Ophir y colaboradores han llevado a cabo experimentos con ratones que expresan dos de las isoformas humanas de ApoE, *apoE3* y *apoE4*. Observaron que, tras la administración intracerebral de LPS, los ratones transgénicos (Tg) para el alelo E4 produjeron un nivel mucho más elevado de citocinas pro-inflamatorias con respecto a los ratones Tg para el alelo E3 (*Ophir et al. 2005*). Esto se asocia con la mayor susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas observada en las personas portadoras de este alelo (*Gaidukov et al. 2010*).

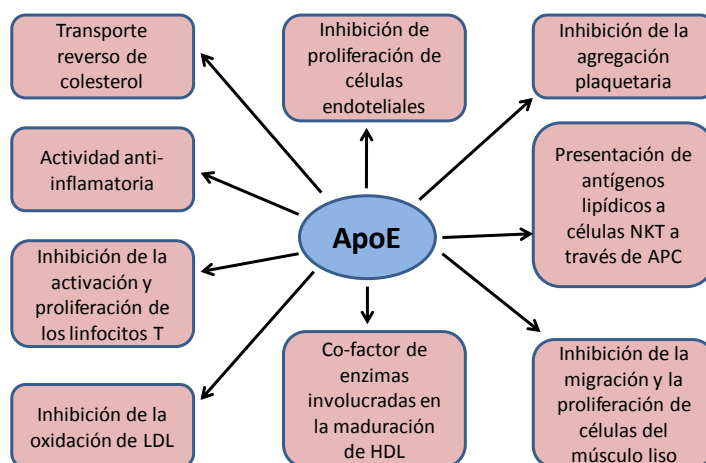


Figura 4: Múltiples funciones de la apolipoproteína E.

6.1) Modelo experimental de aterosclerosis

Las mutaciones en el gen de ApoE tienen como resultado la generación de una apolipoproteína incapaz de unirse a los receptores celulares que la reconocen, o una deficiencia total de ApoE. A esta patología se la denomina **disbetalipoproteinemia** (o hiperlipoproteinemia tipo III). Este trastorno metabólico se caracteriza por altos niveles de VLDL, colesterol total y triglicéridos, y por el desarrollo acelerado de aterosclerosis (*Hasty et al. 1999, Schaefer 2009*). A través de la técnica de disrupción génica en células madre embrionarias se creó un modelo murino de disbetalipoproteinemia humana, en el cual los ratones son deficientes en ApoE (*Piedrahita et al. 1992*). Estos ratones tienen una colesterolemia basal hasta 5 veces más elevada que los ratones de la misma cepa sin dicho defecto genético, con un predominio de las fracciones lipoproteicas LDL y VLDL, y una disminución de la HDL (la fracción mayoritaria en los ratones normales). Además, estos ratones ApoE^{-/-} desarrollan espontáneamente lesiones ateroscleróticas en la pared vascular. A diferencia de los ratones *wild type* (cepa silvestre), los cuales son muy resistentes a cualquier aumento de colesterolemia inducido por dieta, en los ratones ApoE^{-/-} la administración de una dieta hipercolesterolémica aumenta los niveles de colesterol total y éstos desarrollan lesiones ateroscleróticas más severas, dada su incapacidad de producir ApoE (*Bobkova et al. 2004*).

Este modelo de ratones deficientes en ApoE es muy útil para dilucidar los mecanismos inmunológicos por los cuales esta apolipoproteína ejerce sus funciones

inmunomoduladoras (tanto en enfermedades autoinmunes como cardiovasculares). Previamente se ha demostrado que los macrófagos de ratones deficientes en ApoE, cuando son activados *in vitro*, presentan niveles más elevados de citocinas pro-inflamatorias, moléculas MHC II y moléculas co-estimuladoras, con respecto a los ratones normales (*Tenger and Zhou 2003*).

Objetivos

OBJETIVOS

La AR es una enfermedad autoinmune sistémica que se asocia con una alta tasa de mortalidad debida a eventos cardiovasculares, principalmente fenómenos de aterosclerosis (*Carmona et al. 2010*). Si bien los factores de riesgo tradicionales contribuyen a este mayor riesgo de eventos cardiovasculares, el ambiente inflamatorio asociado a la artritis reumatoide es un factor de riesgo adicional clave, acelerando el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (*Ku et al. 2009, Pieringer and Pichler 2011*). Los pacientes con AR activa suelen presentar perfiles lipídicos alterados, con bajos niveles de HDL, altos niveles de triglicéridos, hipercolesterolemia y disfunción endotelial (*Gonzalez-Gay et al. 2005, Pieringer and Pichler 2011*). Además se ha demostrado que un gran porcentaje de las partículas de HDL presentes en el suero de pacientes que padecen AR son disfuncionales y, por ende, pro-inflamatorias (*McMahon et al. 2006*).

ApoE es una apolipoproteína que participa en el metabolismo de lípidos (*Greenow et al. 2005*), formando parte de los quilomicrones y de las lipoproteínas VLDL y HDL. Su papel en el control de la aterosclerosis se evidencia por el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes en ApoE (ApoE^{-/-}) los cuales tienen bajos niveles de HDL y altos de colesterol y LDL. Por el contrario, los ratones normales (WT) son resistentes a esta patología, incluso en presencia de dietas hipercolesterolémicas (*Bobkova et al. 2004*).

Se ha observado que ApoE tiene también un papel inmunomodulador (*Laskowitz et al. 2000, Ali et al. 2005*) lo que convierte a los ratones ApoE^{-/-} en un modelo atractivo para evaluar la repercusión de esta lipoproteína en modelos de inflamación crónica. La disponibilidad de ratones deficientes en ApoE en el fondo genético B10.RIII (H-2^r), que los hace susceptibles al desarrollo de artritis inducida por colágeno tipo II (AIC), nos permite estudiar el papel de ApoE en el modelo experimental considerado como el prototipo de la artritis reumatoide. Al mismo tiempo podríamos evaluar cómo influyen las alteraciones lipídicas, ocasionadas por la ausencia de ApoE, en la inflamación crónica. Finalmente podríamos analizar si la presencia de artritis altera el curso de la aterosclerosis en los ratones predispuestos a esta patología.

En base a todo ello, los objetivos concretos que nos hemos planteado en el siguiente proyecto de tesis doctoral han sido los siguientes:

- 1) Analizar la influencia de la deficiencia en ApoE sobre la evolución de la artritis en ratones con un trasfondo genético susceptible al desarrollo de AIC.
- 2) Evaluar si el desarrollo de artritis en los ratones deficientes en ApoE influye sobre la evolución clínica de la aterosclerosis.
- 3) Comprobar el efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el desarrollo de artritis en ratones deficientes o no en ApoE.
- 4) Estudiar si el desarrollo de artritis en ratones deficientes en ApoE y controles altera el perfil lipídico y las propiedades pro o anti-inflamatorias de las partículas de HDL.

Material y Métodos

1) MATERIAL BIOLÓGICO

1.1) Animales de experimentación

1.1.1) ESTIRPES DE RATONES

En el presente trabajo se utilizaron las estirpes de ratones que se detallan a continuación:

Ratones consanguíneos

- **B10.RIII (B10.RIII.WT)**, suministrados por Harlan Olac (Inglaterra). El haplotipo MHC de estos ratones es H-2^{r/r}, lo cual los hace susceptibles al desarrollo de artritis por colágeno (AIC), tras inmunización con colágeno de tipo II (CII) de origen bovino.

Ratones deficientes

- **B6 deficientes en ApoE** (B6.129P2-ApoE^{tm1Unc/Crl}) (**B6.ApoE^{-/-}**), suministrados por Charles River (USA). Estos ratones fueron generados por N. Maeda y colaboradores (*Piedrahita et al. 1992*) mediante inactivación del gen de ApoE al reemplazar la región codificante del mismo por el gen de resistencia a la neomicina. En estos ratones el MHC es de haplotipo H-2^{b/b} y, por lo tanto, resistente a AIC por CII bovino.
- **B10.RIII deficientes en ApoE (B10.RIII.ApoE^{-/-})**, obtenidos en nuestro laboratorio mediante retrocruzamiento sucesivo, hasta llegar a la 10ª generación, de ratones B6.ApoE^{-/-} con ratones B10.RIII.WT. Después de cada cruce, los heterocigotos ApoE^{+/-} se seleccionaron por amplificación del ADN genómico (*ver apartados 2.3 y 3.1*). Los heterocigotos B10.RIII.ApoE^{+/-} finalmente obtenidos se cruzaron entre sí, seleccionándose los homocigotos B10.RIII.ApoE^{-/-}, en los cuales se comprobó la presencia de un haplotipo H-2^{r/r} que los hacía susceptibles a AIC con CII bovino.

1.1.2) MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron mantenidos y manipulados en las instalaciones del Servicio de Estabulación de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Las cepas convencionales de ratones se mantuvieron en cuartos con sistemas de ventilación y renovación de aire no estéril. La manipulación se realizó siguiendo en todo momento las normas éticas de experimentación con animales especificadas en el Real Decreto 1201/2005 (BOE nº 252) del 10 de Octubre de 2005.

Cuando fue necesaria una sedación ligera, los ratones fueron anestesiados por inhalación de vapores de éter dietílico (Panreac), dentro de una campana de extracción de gases. En el caso de la inmovilización más prolongada para tomar radiografías de las patas, se les inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) 40-50 μ l de una mezcla anestésica compuesta por 3 mg de Ketamina (Ketolar®, Parke-Davis), 300 ng de Diazepam (Valium®, Roche) y 60 ng de Atropina sulfato (B. Braun Medical) (dosis aproximadas, por ratón, para animales de 21-25 g de peso corporal). Los ratones fueron alimentados con pienso balanceado y agua ad libitum. Cuando el experimento lo requirió, algunos grupos fueron alimentados con dieta suplementada con 7,5 g/kg de colesterol (dieta hipercolesterolémica o dieta HC) (S8822-E010, Ssniff®, Alemania).

2) OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.1) Suero

Luego de anestesiar a los ratones con éter dietílico (Panreac), se extrajeron unos 200 μ l de sangre venosa mediante punción del seno retroorbitario. Esta sangre se mantuvo durante toda la noche a 4°C, o durante unas horas a TA, para permitir la retracción del coágulo. Posteriormente el suero se obtuvo por centrifugación durante 5' a 6500 rpm. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

2.2) Suspensiones celulares

Tras sacrificar al ratón por dislocación cervical, se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales y paraaórticos, y se mantuvieron en PBS a 4°C. A continuación fueron macerados en PBS estéril y las suspensiones celulares se lavaron en PBS-1% BSA mediante centrifugación a 2000 rpm durante 3' a 4°C. Luego las células se resuspendieron en PBS-1% BSA para su recuento en una cámara de Neubauer. Las células muertas se descartaron mediante exclusión con Azul Tripan (GIBCO®, Invitrogen).

Estas suspensiones celulares fueron utilizadas tanto para la caracterización fenotípica, mediante citometría de flujo, como para los ensayos de cultivo celular.

2.3) ADN genómico

El ADN genómico se extrajo a partir de tejido, utilizando un kit comercial (High Pure PCR Template preparation kit, Roche) y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Brevemente, se obtuvieron fragmentos de 3-5 mm del extremo de la cola de ratones de 4 semanas de edad. El tejido se lisó por incubación con un tampón de lisis y en presencia de la enzima Proteinasa K. Posteriormente se hizo pasar la solución por unas columnas (provistas en el mencionado kit) que poseen un filtro que retiene el ADN. Por último, se procedió al lavado con diversos tampones, con el fin de eliminar contaminantes de la PCR, sales, proteínas y otras impurezas, y poder así eluir el ADN en una solución tampón adecuada. Todos los tampones utilizados durante la extracción del ADN genómico fueron provistos con el kit comercial.

2.4) ARN total a partir de órganos de ratón

Tras sacrificio de los ratones, se extrajeron los órganos de interés (ganglios, manos, patas), conservándolos a -80°C hasta el momento de su utilización. Para la obtención de ARN, las muestras se congelaron, agregando nitrógeno líquido, y se homogeneizaron en un mortero de porcelana. El homogeneizado se mezcló con una solución de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol®, Invitrogen), con el fin de lisar las membranas celulares. Posteriormente se agregó cloroformo y se centrifugaron los homogeneizados. De esa manera, la solución quedó separada en una fase acuosa y una fase orgánica. Dado que el ARN se mantiene exclusivamente en la fase acuosa, se recogió dicha fase y se precipitó el ARN con isopropanol. A continuación se hicieron lavados de la muestra y el ARN precipitado fue resuspendido en agua DEPC (SERVA). Por último se incubaron las muestras a 55°C durante 5', para lograr una completa disolución del ARN en el agua DEPC. Se determinó la concentración de ARN en cada muestra midiendo su absorbancia a 260 nm (y teniendo en cuenta la relación A260/A280 como indicador de la pureza del ADN).

3) TÉCNICAS

3.1) Determinación del genotipo de los animales por PCR

Para genotipar a los ratones obtenidos de los diferentes cruces, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN obtenido a partir de fragmentos de 3-5 milímetros de la cola de ratones de 4 semanas de edad (*ver apartado 2.3*).

Para la amplificación por PCR se preparó una mezcla de reacción que consistió en 2,5 mM de $MgCl_2$ (Bioline), 0,25 mM de cada dNTP (Bioline), 0,5 μM de cebadores, 0,2 U de enzima BioTaq DNA Pol (Bioline) y 2 μl de ADN, en un volumen final de 20 μl . El programa de amplificación se desarrolló en un termociclador Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems). La información acerca de los cebadores utilizados para dicha amplificación se detalla en la **tabla 1**.

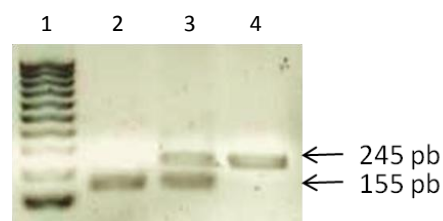
Reacción de PCR	Cebador	Secuencia (5'-3')
Genotipado ratones ApoE	180	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG
	181	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAG
	182	GCCGCCCCGACTGCATCT

Tabla 1: Cebadores utilizados para PCR convencional.

La reacción de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial del ADN a 94°C por 3', seguido por 30 ciclos de 20'' a 94°C, 40'' a 68°C y 1' a 72°C, culminando con un paso de extensión adicional a 72°C por 10'.

Para visualizar el resultado de la reacción de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE-0,5%, que contenía un volumen 1:20.000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (RedSafe, Intron Biotechnology). Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador de 100 a 1000 pb (EZ Load 100 bp Molecular Ruler, BIORAD). Las bandas de ADN se visualizaron exponiendo el gel a radiación ultravioleta (UV) en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc, BioRad). De esta manera, en los ratones WT sólo se observó una banda a 155 pb, en los ApoE^{-/-} una a 245 pb, mientras que en los ApoE^{+/-} dos bandas, una a 155 pb y otra a 245 pb (**Figura 1**).

Figura 1: Determinación del genotipo por PCR convencional. *Calle 1:* Marcador de peso molecular (EZ Load 100 bp Molecular Ruler, BIORAD), *Calle 2:* Control ApoE^{+/+} (WT), *Calle 3:* Control ApoE^{+/-}, *Calle 4:* Control ApoE^{-/-}.



3.2) Modelo experimental de artritis inducida por colágeno (AIC)

3.2.1) INDUCCIÓN DE ARTRITIS

Para la inducción de artritis por colágeno (AIC), se administró colágeno de tipo II (CII) bovino a ratones machos de la cepa B10.RIII, portadores del haplotipo H-2^{r/r}, lo cual los hace susceptibles al desarrollo de artritis. El CII purificado, suministrado por la Dra. Marie Griffiths (Department of Rheumatology, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA), se extrajo del cartílago sinovial de terneros mediante métodos de preparación y purificación previamente descritos (Wooley *et al.* 1985, Stuart, Townes and Kang 1985). Para su administración, el CII se disolvió en ácido acético 0,05 M, a una concentración de 2 mg/ml. Esta solución se mantuvo en agitación constante toda la noche a 4°C. Luego se realizó una emulsión fría con adyuvante completo de Freund (CFA, 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*; Chondrex), empleando volúmenes equivalentes de CII y CFA, inyectándose 150 µl (150 µg de CII) de la emulsión por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola de ratones de entre 8 y 12 semanas de edad. En algunos experimentos se administró PBS emulsionado en CFA, como control negativo.

3.2.2) VALORACIÓN CLÍNICA

Para valorar el comienzo de la artritis, así como el desarrollo y evolución de la misma, se examinaron las extremidades de los ratones una vez por semana, desde la semana 3 hasta la 8-12 post-inmunización (p.i.), momento en que se procedió a su sacrificio. La severidad de la patología en cada una de las cuatro extremidades se determinó mediante un protocolo previamente descrito (Wooley *et al.* 1985). Según este protocolo, se asigna a cada pata un valor del 0 al 3, siguiendo los siguientes criterios: **0**= normal, **1**= enrojecimiento e inflamación de las articulaciones de los dedos, **2**= enrojecimiento e inflamación del carpo/tarso, **3**= anquilosis de la articulación afectada. El *score* clínico utilizado para el análisis estadístico es la suma de los valores de afectación en cada una de las patas, por lo cual el rango de severidad de la artritis en cada animal varía entre 0 (ausencia de artritis) y 12 (artritis con anquilosis en las cuatro extremidades).

3.2.3) VALORACIÓN RADIOLÓGICA

En ratones anestesiados con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina (ver apartado 1.1.2) se tomaron radiografías de las 4 patas. Para ello se utilizó una fuente de Rayos X de 70 Kw y con una exposición de 90 ms (Trophy Irix X-Ray System; Kodak Spain,

Madrid). Las imágenes se digitalizaron usando un software de imagen (*Trophy Digital Imaging system*), valorándose 4 tipos de lesiones radiológicas en las imágenes obtenidas: **a)** Inflamación de tejidos blandos (edema), **b)** osteopenia yuxtaarticular debida a alteraciones en la densidad ósea, **c)** estrechamiento o desaparición del espacio articular, y **d)** irregularidades de la superficie ósea, por erosiones marginales o neoformación de tejido óseo periostial. Cada una de estas lesiones fue cuantificada según la siguiente escala:

- * **0**- ausencia de lesiones.
- * **1**- local: afectación de la articulación de un dedo o del carpo/tarso.
- * **2**- difusa: afectación de dos o más dedos y/o dos o más articulaciones en dedos distintos, en el carpo o en el tarso.

Sumando los valores de afectación en cada una de las cuatro patas se obtuvo un *score* de severidad radiológica de 0 a 8.

3.2.4) PROCESAMIENTO PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS ARTICULACIONES

Para determinar el grado de afectación articular tras la inducción de AIC se realizaron estudios histológicos de las patas. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y sus patas delanteras y traseras fueron fijadas en formol tamponado al 4% durante 24 horas. A continuación se introdujeron en una solución descalcificadora (ácido fórmico al 4% y ácido clorhídrico al 4%) durante 48 horas. Posteriormente se realizó otra fijación en formol durante 24 horas más. Al quinto día las muestras fueron deshidratadas en alcohol y xilol a concentraciones crecientes desde el 70% hasta el 100% y finalmente se incluyeron en parafina. Secciones de 5 µm de grosor se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) usando métodos convencionales (*Bancroft and Bellairs 1977*) y se valoraron con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E400), tomando fotografías con el objetivo de 10X.

3.3) Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos anti-CII por ELISA

Se valoraron los niveles de anticuerpos anti-CII en el suero de los ratones inmunizados con CII-CFA por ELISA. Para ello, se incubaron placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) durante toda la noche (o/n) a 4°C con CII (20 µg/ml), disuelto en tampón Tris-HCl 0,05 M a pH 7,5; NaCl 0,2 M que favorece la unión del Ag a la placa. Se hicieron varios lavados con PNT (Solución 6,84 mM Na₂HPO₄ + 3,17 mM NaH₂PO₄, a pH 7,2; 0,2 M NaCl; 0,05% Tween-20) y luego las placas fueron incubadas durante al menos 2 horas con

solución de bloqueo (PNT-1% BSA), para saturar los sitios de uniones inespecíficas. Luego se lavaron con PNT y se añadieron los sueros experimentales, por duplicado, en un rango de diluciones entre 1:1000 y 1:2000 dependiendo de la inmunoglobulina a detectar. Como control positivo y para la realización de la curva patrón se utilizó una mezcla de sueros testada previamente con niveles elevados de anticuerpos anti-CII. La incubación se realizó durante 3 horas a TA. Las placas, previamente lavadas, fueron luego incubadas durante 3 horas con anticuerpos específicos frente a IgG₁ e IgG_{2a} murinas, conjugados a fosfatasa alcalina (SIGMA). La reacción enzimática se valoró tras añadir una dilución de pNPP (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, SIGMA) como sustrato para la fosfatasa alcalina, utilizando un equipo Multiskan® FC (Thermo Scientific) con un filtro de 405 nm. Los datos obtenidos, a los que se les restó el blanco, fueron representados en U/ml, interpolando a partir de los valores de concentración de la curva patrón.

3.4) Estudio de las subpoblaciones celulares de los órganos linfoides.

3.4.1) CARACTERIZACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN LINFOCITARIA iTreg

Para el estudio de la subpoblación linfocitaria iTreg, las células obtenidas de los ganglios inguinales y paraaórticos (*ver apartado 2.2*) se incubaron inicialmente durante 10' a TA con una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo IgG_{2b} de rata anti-FcγRII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2), para bloquear los receptores de Fc. Luego se marcaron extracelularmente con un anticuerpo monoclonal anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (dilución 1:500) y otro anti-CD25-APC (dilución 1:500) durante 30' a 4°C. A continuación se hizo un lavado con PBS y se procedió a incubar las células con una solución fijadora/permeabilizadora (eBioscience) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las células con PBS y se hizo un marcaje intracelular con un anticuerpo anti-Foxp3-PE (dilución 1:50), incubando las células durante 30' a 4°C. Los detalles de los anticuerpos monoclonales utilizados para la caracterización de esta población linfocitaria por citometría de flujo se detallan en la **tabla 2**.

Por último, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 250 µl de PBS. La subpoblación celular iTreg fue caracterizada por citometría de flujo (FACScanto II, Becton-Dickinson). El programa utilizado para el análisis de estas poblaciones fue el FACSDiva (BD Biosciences).

Anticuerpo	Isotipo	Clon	Fluorocromo
Anti-CD4 murino	IgG _{2b} , κ de rata (Lewis)	GK1.5	PerCP-Cy5.5
Anti-IL-17A murina	IgG1, κ de rata	TC11-18H10	PE
Anti-IFNγ	IgG1, κ de rata	XMG1.2	FITC
Anti-CD25	IgG1, λ de rata	PC61.5	APC
Anti-Foxp3	IgG _{2a} , κ de rata	FJK-16S	PE

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para caracterizar las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo. Los anticuerpos anti-CD4, CD25 e IL-17A Fueron adquiridos en BD Pharmingen, mientras que los anticuerpos anti- Foxp3 e IFNγ fueron adquiridos en eBioscience.

3.4.2) CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Th1 Y Th17

Con el fin de estudiar las subpoblaciones celulares Th1 y Th17, se hicieron cultivos de las células de los ganglios (obtenidas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2) en placas de 48 pocillos, a una densidad de $2 \cdot 10^6$ células/pocillo y en presencia de 50 ng/ml de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, SIGMA) y 750 ng/ml de Ionomicina (*Ionomycin, free acid, S. Conglobatus*; Calbiochem) a 37°C. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (GIBCO®, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino, HEPES, L-glutamina, penicilina-streptomina, β-mercaptoetanol y piruvato sódico (SIGMA). Luego de 2 horas se agregó 0,8 μl/ml de Brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences) y se volvieron a incubar las células a 37°C durante 2 horas más.

A continuación se bloquearon los receptores de Fc por incubación de las células durante 10' a TA, con una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo IgG_{2b} de rata anti-FcγRII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2). Luego se añadió un anticuerpo monoclonal anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (dilución 1:500). Tras una incubación de 30' a 4°C en oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una solución fijadora/permeabilizadora (Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences) a 4°C o/n. Al día siguiente, luego de un lavado con tampón de permeabilización (*10X permeabilization buffer*, eBioscience), las suspensiones celulares fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-IL-17-PE y anti-IFNγ-FITC (dilución 1:50) durante 30' a 4°C. Los detalles de los anticuerpos monoclonales utilizados para la caracterización de estas dos poblaciones linfocitarias por citometría de flujo se detallan en la **tabla 2**.

Tras el marcaje intracelular con los AcM, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 250 µl de PBS. Las subpoblaciones celulares Th1 y Th17 se caracterizaron por citometría de flujo (FACScanto II, Becton-Dickinson), y utilizando posteriormente el programa FACSDiva (BD Biosciences) para el análisis de las subpoblaciones.

3.5) Estudio de la expresión de citocinas por PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real

3.5.1) RETROTRANSCRIPCIÓN

Para obtener ADNc a partir del ARN purificado, se realizó una reacción de retrotranscripción. Para ello se mezclaron 5 µg de ARN con dNTPs, *random primers*, DTT, inhibidor de ARNasas, y transcriptasa reversa (SuperScript® II RT, Invitrogen), llevando cada muestra a un volumen final de 20 µl. La reacción de retrotranscripción consistió en los siguientes pasos: 5' a 65°C, 10' a 25°C, 50' a 42°C, con un paso final de 15' a 70°C.

3.5.2) AMPLIFICACIÓN DEL ADNc POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para la reacción de PCR cuantitativa (qPCR), se mezclaron 250-500 ng de ADNc con la premezcla de reacción (Premix Ex Taq 2X, TAKARA), la sonda de la citocina a analizar y la sonda de GAPDH, llevando la mezcla de reacción a un volumen final de 22 µl con agua estéril (de calidad para biología molecular). Las sondas Taqman específicas para cada citocina (Applied Biosystems) estaban conjugadas al fluorocromo FAM, mientras que la sonda Taqman específica para GAPDH (Eurogentec) estaba conjugada al fluorocromo HEX (Se pueden encontrar detalles de las sondas Taqman utilizadas en las **tablas 3 y 4**).

Citocina	Ref. librería sondas TaqMan (Applied Biosystems)
IL-1β	Mm00434228_m1
IL-4	Mm00445259_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-17A	Mm00439619_m1
IL-21	Mm00517640_m1
TNFα	Mm00443258_m1
IFNγ	Mm00801778_m1
TGFβ1	Mm00441724_m1

Tabla 3: Referencias de las citocinas utilizadas en los ensayos de qPCR para evaluar expresión génica (Applied Biosystems). Todas las citocinas fueron adquiridas conjugadas al fluorocromo FAM.

Gen	Secuencia sonda-YY (5'-3')	Secuencia cebadores (5'-3')
GAPDH murina	CGTGCCGCCTGGAGAAACCTGCC	CAACCTGGTCCTCAGTGTAGC
		AATGTGTCCGTCGTGGATCTG

Tabla 4: Cebadores y sonda utilizados como control de expresión constitutiva en los ensayos de qPCR para evaluar expresión génica (Eurogentec). La sonda está conjugada al fluorocromo HEX.

Se cargaron duplicados de cada muestra en placas de 96 pocillos y se llevó a cabo el siguiente protocolo de amplificación, en un termociclador Step One Plus (Applied Biosystems): 2' a 50°C, 10' a 95°C, seguido por 40-45 ciclos de 15'' a 95°C y 1'a 60°C. El análisis de los resultados se realizó con el método de $\Delta\Delta C_t$, representando la expresión génica relativa de cada una de las citocinas, normalizada con respecto a la de GAPDH.

3.6) Estudio de las lesiones ateroscleróticas

Para el estudio de las lesiones ateroscleróticas se disecó la aorta ascendente a nivel de los senos aórticos de los ratones de los distintos grupos de estudio. Una vez incluidos en parafina, se cortaron 8-10 secciones de 5 μ m de grosor, a intervalos de 50 μ m y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E). El tamaño de la lesión fue determinado por morfometría, con la ayuda de un ordenador, y se expresó como el porcentaje de la superficie de la aorta ocupado por las lesiones, aplicando la siguiente fórmula: (Σ del área de lesión / Σ del perímetro interno total de la aorta) x 100. Para la caracterización celular de las lesiones ateroscleróticas, se detectaron los macrófagos por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal de rata anti-Mac2 conjugado a biotina (clon M3/38; Cedarlane Laboratories). Posteriormente se incubó con Streptavidina conjugada a HRP (BD Biosciences) y luego con di-amino bencidina (DAB) como sustrato (Dako Diagnostics). La coloración de contraste utilizada fue Hematoxilina y Eosina. El marcaje con Mac2 se expresó como el porcentaje de la superficie marcada dentro de la lesión (x 100).

3.7) Determinación del perfil lipídico de los ratones

3.7.1) DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL, LDL/VLDL Y HDL EN SUERO

Los niveles de colesterol total y de las fracciones lipídicas HDL y LDL/VLDL en suero de ratones fueron determinados a través de un método enzimático colorimétrico (ADVIA® Chemistry Systems, Siemens), a partir de 40 μ l de muestra.

3.7.2) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS EN SUERO

Los niveles de triglicéridos en suero de ratones fueron determinados con un kit comercial basado en métodos enzimáticos colorimétricos (Triglycerides, GPO-POD, Liquid Spinreact), a partir de 10 µl de muestra, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.7.3) AISLAMIENTO DE LIPOPROTEÍNAS

Dado que el volumen de suero obtenido de los ratones era insuficiente para aislar las lipoproteínas individualmente, se hicieron mezclas de 4-6 sueros de los diferentes grupos experimentales de ratones.

El aislamiento de las fracciones lipoproteicas que contenían ApoB se llevó a cabo por ultracentrifugación secuencial (VLDL $< 1,006$ kg/L, LDL $1,019 < d < 1,063$ kg/L), ajustando con KBr las soluciones a las que flota la fracción lipoproteica de interés (y habiendo hecho flotar previamente la fracción de densidad menor). Se utilizó un rotor vertical (NVT-65, Beckman) a 55.000 rpm a 10°C por 5 horas para purificar las lipoproteínas LDL y VLDL. La HDL (HDL $1,064 < d < 1,21$ Kg/L) fue purificada por ultracentrifugación secuencial rápida utilizando un rotor vertical (NVT-65, Beckman) a 55.000 rpm a 10°C por 18 horas. Todas las soluciones utilizadas para la purificación de HDL estaban libres de EDTA y contenían 1 mmol/L de Cl_2Ca para conservar la actividad de la enzima PON1.

3.7.4) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La actividad enzimática de la PON1 se determinó a través de su actividad arilesterasa, medida a través de la hidrólisis de fenilacetato. Una unidad (U) de actividad arilesterasa equivale a 1 nmol de sustrato transformado por minuto. La actividad arilesterasa de la PON1 sensible a EDTA fue calculada restando la actividad arilesterasa resistente a EDTA. Esta última fue determinada utilizando 1 mmol/L de EDTA en el buffer de reacción, en vez de Cl_2Ca , el cual fue utilizado para determinar la actividad arilesterasa total.

La actividad enzimática de PAF-AH se determinó con un kit comercial (Cayman Chemical), donde una unidad (U) de actividad PAF-AH equivale a 1 nmol de sustrato transformado por minuto.

3.7.5) ENSAYOS DE OXIDACIÓN EN LIPOPROTEÍNAS: MONITORIZACIÓN DE FORMACIÓN DE DIENOS CONJUGADOS

La capacidad antioxidante de la HDL se determinó incubando LDL humana con HDL purificada de cada grupo experimental, y midiendo luego el grado de oxidación de las lipoproteínas después de una incubación en condiciones oxidantes. Se utilizó LDL humana dado que es difícil obtener volúmenes adecuados de LDL de ratón, y ya que la oxidación de la LDL humana ha sido exhaustivamente estudiada. Las lipoproteínas purificadas fueron dializadas en PBS antes de ser utilizadas en los ensayos.

Para este ensayo se incubó LDL humana (0,1 mmol/L de fosfolípidos) en presencia de HDL murina purificada (0,13 mmol/L de fosfolípidos), igualando la cantidad de HDL en todos los grupos. Como control se incubó LDL humana en ausencia de HDL. Luego se agregaron 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de CuSO_4 , y se monitorizó la absorbancia a 234 nm durante 4 horas a 30°C en un espectrofotómetro Biochrom 4060 equipado con un intercambiador de siete cubetas termostatizadas (Pharmacia LKB). La incubación de proteínas en presencia de un catalizador de la oxidación, como el CuSO_4 , produce una reestructuración de los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), lo cual da lugar a la formación de dienos conjugados (dobles enlaces alternados con enlaces simples). Esta estructura puede ser detectada midiendo su absorbancia a 234 nm. Existen tres fases durante la oxidación: una fase de latencia o *lag phase* (donde las defensas antioxidantes de la lipoproteína actúan y la oxidación es lenta), una fase exponencial (donde la oxidación ocurre rápidamente), y una fase de descomposición (donde los sustratos oxidables de la lipoproteína se han oxidado, y los dobles enlaces se descomponen dando lugar a productos finales de la oxidación como peróxidos, hidróxidos, aldehídos y cetonas). Es decir que cuanto mayor es la *lag phase*, menor es la oxidación de la LDL (y mayor capacidad anti-oxidante de la HDL). En base a las mediciones a 234 nm se obtiene la fase *lag* relativa a la cinética de la LDL oxidada en ausencia de HDL. Y utilizando este resultado, se puede calcular el porcentaje de protección de oxidación de la LDL aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de protección} = \frac{\text{Lag time de la muestra (en segundos)}}{\text{Lag time de la LDL oxidada en ausencia de HDL (en segundos)}} \times 100$$

Este ensayo se hizo también emulando las condiciones fisiológicas, donde hay 2-3 veces menos de HDL en los ratones deficientes en ApoE. Para ello se repitieron las mismas

condiciones del experimento, pero agregando 2-3 veces menos de HDL en el grupo de sueros de ratones ApoE^{-/-}.

3.8) Determinación de la concentración de ApoE en suero por ELISA

Se valoraron por ELISA los niveles séricos de ApoE en los ratones inmunizados con CII-CFA, con/sin dieta hipercolesterolémica, optimizando las condiciones de ELISA descritas por Hirsch-Reinshagen V y colaboradores (*Hirsch-Reinshagen et al. 2009*). Para ello, las placas (Maxisorp, Nunc) se incubaron durante toda la noche (o/n) a 4°C con un AcM humano, WUE-4 (0,1 µg/ml) (Novus Biologicals), usando un tampón específico que favorece la unión a placa, BBC (0,15 M de Na₂CO₃; 0,35 M de NaHCO₃; 0,03 M de NaN₃; pH 9,6). Tras lavado con PBS, las placas se incubaron durante al menos 1 hora con solución de bloqueo (PBS-1% BSA). Luego se añadieron los sueros experimentales por duplicado (a dilución 1:2000). Para la curva patrón se usó un estándar de ApoE murino purificado (cedido por el Dr. Karl Weisgraber, Gladstone Institute of Neurological Disease, San Francisco, USA). La incubación se realizó o/n a TA. Luego las placas se lavaron con PBS y fueron incubadas durante 3 horas con un Ac de cabra anti-ApoE (1:8000) (Calbiochem). Posteriormente se incubaron las placas con un Ac anti-cabra-biotinilado (1:5000) (Vector Laboratories) por 3 horas a TA y, previo lavado de las mismas con PBS, se agregó Streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (1:1500) (BD Pharmingen). La reacción enzimática se valoró tras añadir pNPP (*4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, SIGMA) como sustrato para la fosfatasa alcalina, usando un equipo Multiskan® FC (Thermo Scientific) con un filtro de 405 nm. A los datos obtenidos se les restó el blanco y fueron representados en µg/µl, interpolando a partir de los valores de concentración de la curva patrón.

4) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se hizo utilizando un test t de Student para comparar dos grupos, y el test de Mann-Whitney como análisis posterior. Para comparar tres o más grupos se utilizó el One-way ANOVA y el test de Tukey como análisis posterior. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando $p > 0,05$ (ns), significativas cuando $p \leq 0,05$ (*), muy significativas si $p < 0,01$ (**) y altamente significativas cuando $p < 0,001$ (***). Para interpolar datos a partir de una curva standard se utilizó el análisis de regresión no lineal. En todos los casos se utilizó el programa GraphPad Prism® 3.0.

Resultados

1) LA AUSENCIA DE ApoE EN LOS RATONES B10.RIII.ApoE^{-/-} AUMENTA LA SEVERIDAD DE LA AIC.

Con el fin de determinar si la presencia de ApoE influye sobre la progresión clínica de la AIC, ratones B10.RIII (H-2^r), deficientes en esta apolipoproteína o normales (*wild type*: WT) de 8-12 semanas de edad se inmunizaron con 150 µg de CII de origen bovino emulsionado en CFA. Semanalmente se monitorizó la severidad clínica de la artritis mediante examen de las extremidades en ambos grupos, completándose el seguimiento clínico con una valoración radiológica a las 4 y 8 semanas, y un examen anatomopatológico post-mortem entre las semanas 8 y 12 tras la inmunización.

Tal como se puede observar en la **Figura 1**, la artritis en los ratones deficientes en ApoE mostró una mayor severidad clínica que en los ratones WT, y además tuvo un inicio más precoz.

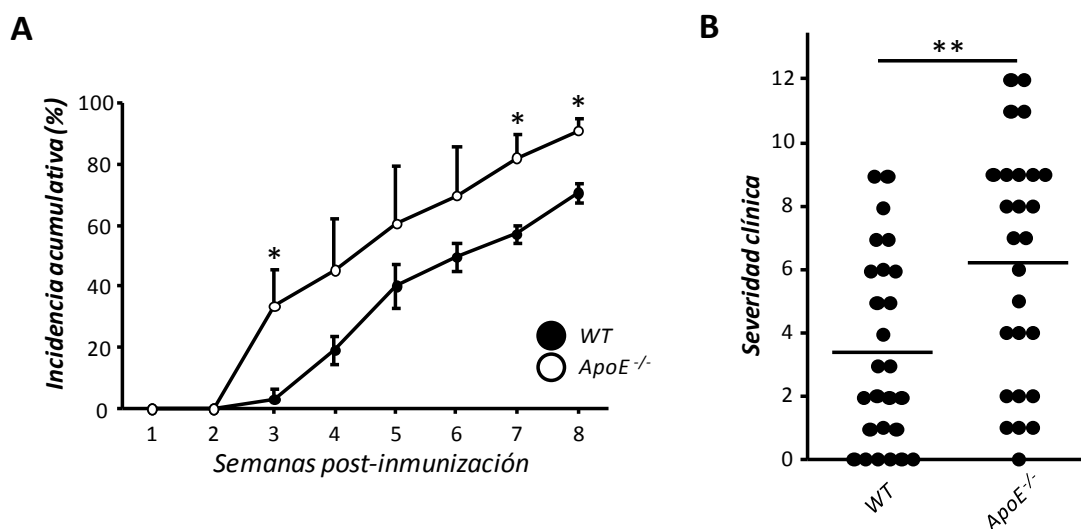


Figura 1: Machos B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad se inmunizaron con CII-CFA. **A)** Incidencia acumulada de animales con AIC. Los resultados se expresan como la media ± SD del porcentaje de ratones afectados en las semanas indicadas post-inmunización, en tres experimentos independientes (26 ratones/grupo). **B)** Severidad clínica de AIC 8 semanas post-inmunización con CII-CFA. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes. Se expresa la severidad clínica de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias estadísticas entre los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo.

Esto se corroboró también a nivel radiológico, observándose un mayor grado de inflamación tisular (edema), alteraciones en la densidad ósea (osteopenia yuxtaarticular), estrechamiento o desaparición total del espacio articular y aparición de irregularidades en la superficie de los huesos (erosiones marginales) en los ratones deficientes en ApoE que en los controles WT inmunizados (**Figura 2A**), con diferencias estadísticamente significativas en los cuatro parámetros analizados (**Figura 2D**). También se hizo un estudio histológico de las articulaciones, observándose en los ratones inmunizados infiltración de células inflamatorias, formación de pannus, destrucción de cartílago y erosión ósea, siendo todas estas alteraciones mucho más severas en los animales ApoE^{-/-} que en los ratones WT (**Figuras 2C y 2D**).

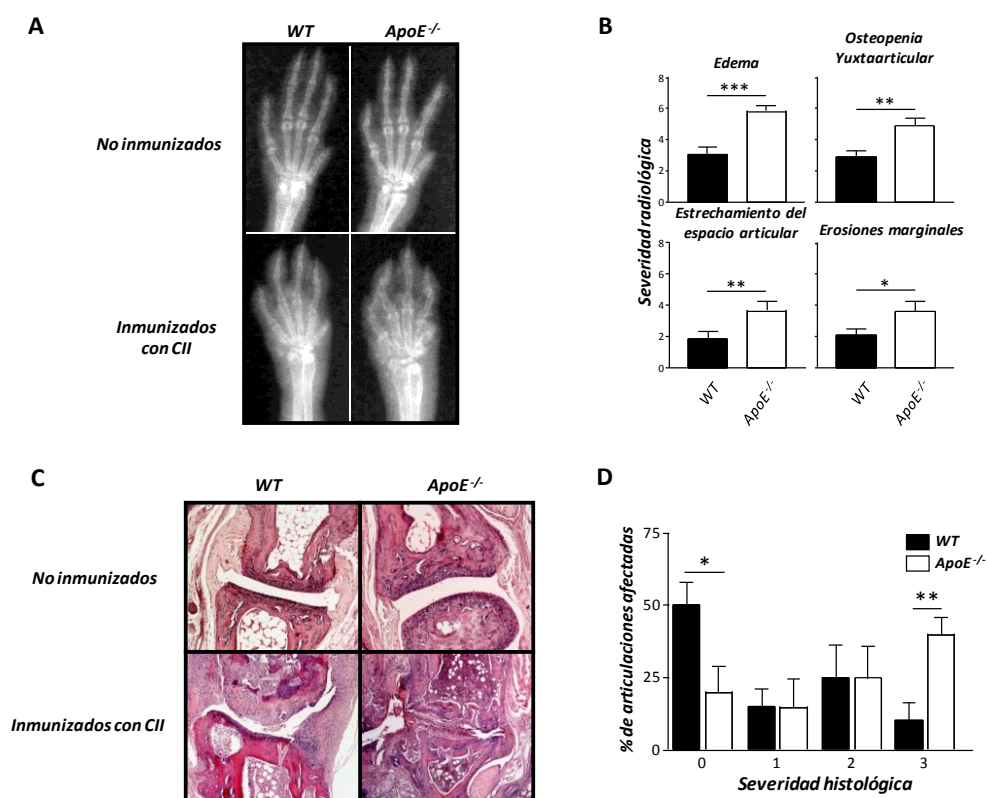


Figura 2: Lesiones radiológicas e histopatológicas de AIC en ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} y WT. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad con CII-CFA. **A)** Imágenes radiológicas representativas de las patas delanteras de ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} no inmunizados y 8 semanas post-inmunización. **B)** Severidad radiológica de cuatro parámetros expresados como la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes (20-25 ratones/grupo). **C)** Histología representativa de las articulaciones (x10) de ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} no inmunizados y 8 semanas post-inmunización. **D)** Severidad histológica de las articulaciones 8 semanas post-inmunización expresado como la media $\pm$ SD del porcentaje de articulaciones atribuido a cada grupo de severidad, a partir de tres experimentos diferentes (20-25 ratones/grupo). En B y D las diferencias estadísticas entre los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} se indican como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo.

2) EL PADECIMIENTO DE ARTRITIS EN RATONES B10.RIII.ApoE^{-/-} NO MODIFICA SU PERFIL LIPÍDICO.

Está descrito que los ratones ApoE^{-/-} tienen niveles elevados de colesterol, LDL, VLDL y triglicéridos en sangre (Bobkova et al. 2004), y es por ello que se midieron los niveles en suero de estos parámetros antes de la inmunización y 8 semanas después. Los ratones ApoE^{-/-} presentaron mayores niveles circulantes de colesterol total y triglicéridos que los ratones WT 8 semanas después de la inmunización con CII ($p < 0,001$) (**Figura 3**). Estos mayores niveles de colesterol se debían principalmente a un aumento en la fracción LDL/VLDL. El desarrollo de AIC no modificó el perfil lipídico de los ratones de ambos grupos 8 semanas después de la inmunización, siendo similar al observado antes de la inmunización (no se muestra).

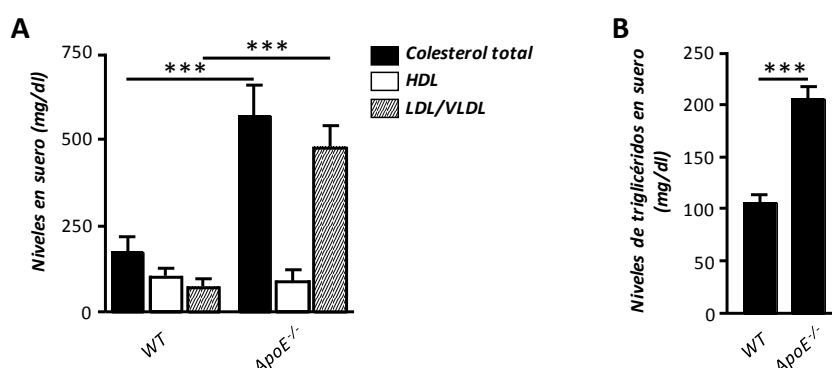


Figura 3: Perfil lipídico en el suero de ratones durante el desarrollo de AIC. Los niveles de colesterol total, HDL y VLDL/LDL (**A**) y los niveles de triglicéridos (**B**) fueron medidos en el suero de machos B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} a día 0 (no se muestra) y 8 semanas después de la inducción de AIC. Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes expresados como la media $\pm$ SD (8-10 ratones/grupo). Las diferencias estadísticas entre los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} se indican como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo.

3) LA AUSENCIA DE ApoE MODIFICA EL PATRÓN DE RESPUESTA DE ANTICUERPOS anti-CII EN LOS RATONES INMUNIZADOS CON CII.

Con el fin de estudiar la participación de las respuestas humores y de los diferentes subtipos funcionales de células T CD4⁺ en el desarrollo de AIC acelerada en los ratones ApoE^{-/-}, se cuantificaron los niveles de las subclases IgG₁ e IgG_{2a} anti-CII en el suero de los ratones WT y ApoE^{-/-} a las 8 semanas de la inmunización con CII, mediante ELISA. La

producción de IgG₁ anti-CII indica un patrón de respuesta de tipo Th2, mientras que la IgG_{2a} se asocia al patrón Th1.

En ambos grupos de ratones se desarrolló una marcada respuesta humoral frente al CII. Sin embargo, mientras que los niveles de IgG_{2a} anti-CII fueron similares entre ambos grupos (**Figura 4A**), los de IgG₁ anti-CII estaban claramente reducidos en los ratones deficientes en ApoE con respecto a los WT (**Figura 4B**). La respuesta inmune anti-CII era específica ya que, a las 8 semanas de la inducción de AIC, los niveles totales de IgG₁ e IgG_{2a} en el suero fueron similares entre los ratones WT y los ApoE^{-/-} (IgG₁ total en WT: $0,9 \pm 0,4$ mg/ml; IgG₁ total en ApoE^{-/-}: $1,1 \pm 0,3$ mg/ml; IgG_{2a} total en WT: $3,6 \pm 1,1$ mg/ml; IgG_{2a} total en ApoE^{-/-}: $3,1 \pm 1,7$ mg/ml; $p > 0,5$ en ambos casos).

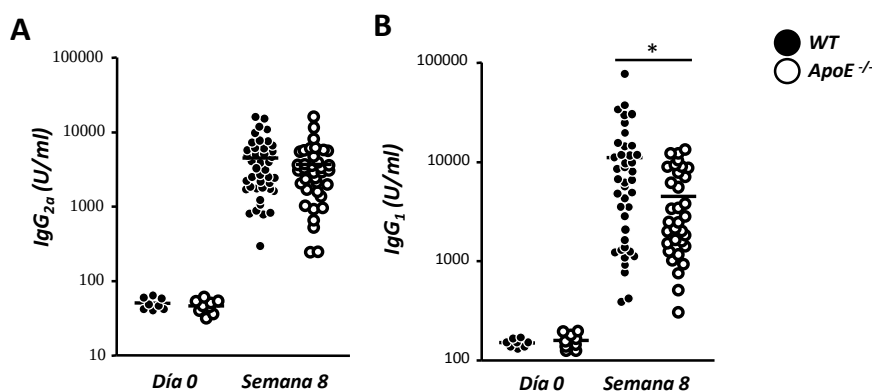


Figura 4: Respuestas de anticuerpos anti-CII alteradas en ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Machos B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad se inmunizaron con CII-CFA. Niveles en suero de IgG_{2a} anti-CII (**A**) e IgG₁ anti-CII (**B**) antes de la inmunización con CII-CFA y 8 semanas después, determinados por ELISA. Se expresan los valores de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias estadísticas entre los ratones B10.RIII.WT y los B10.RIII.ApoE^{-/-} se indican como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo.

4) EN LOS RATONES B10.RIII.ApoE^{-/-} INMUNIZADOS CON CII LA EXPRESIÓN ARTICULAR DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS Th1 Y Th17 ES MAYOR QUE EN LOS B10.RIII.WT.

Dado que los ratones ApoE^{-/-} desarrollaron una AIC más severa y que presentaron menores niveles de anticuerpos anti-CII del subtipo IgG₁ con respecto a los ratones WT, se decidió evaluar en estos ratones el patrón de expresión articular de citocinas durante la inducción de AIC, por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Con este fin se extrajo el ARN de

las patas de ratones 8 semanas después de la inmunización con CII, y se determinaron los niveles de expresión de IL-1 β , TNF α , IL-6, TGF β 1, IFN γ , IL-4, IL-17 e IL-21. En las articulaciones de los ratones WT se observó un aumento en la expresión de los transcritos de IL-1 β , TNF α e IL-6 (citocinas artritogénicas) a las 8 semanas de la inducción de AIC (**Figura 5**). En estos ratones se observó además un aumento en los niveles articulares de ARN_m de IFN- γ e IL-17 luego de la inmunización, pero no se observaron cambios en los niveles de TGF β 1, IL-4 e IL-21. En los ratones ApoE^{-/-}, y en paralelo con el desarrollo de una artritis más severa, se observó también un aumento en la expresión de los transcritos para IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17 e IL-21 en la articulaciones, siendo este aumento más marcado que el observado en los ratones WT. En cambio, el incremento en la expresión de los transcritos de TNF α , TGF β 1 e IL-4 fue de la misma magnitud que el observado en los ratones WT inmunizados (**Figura 5**).

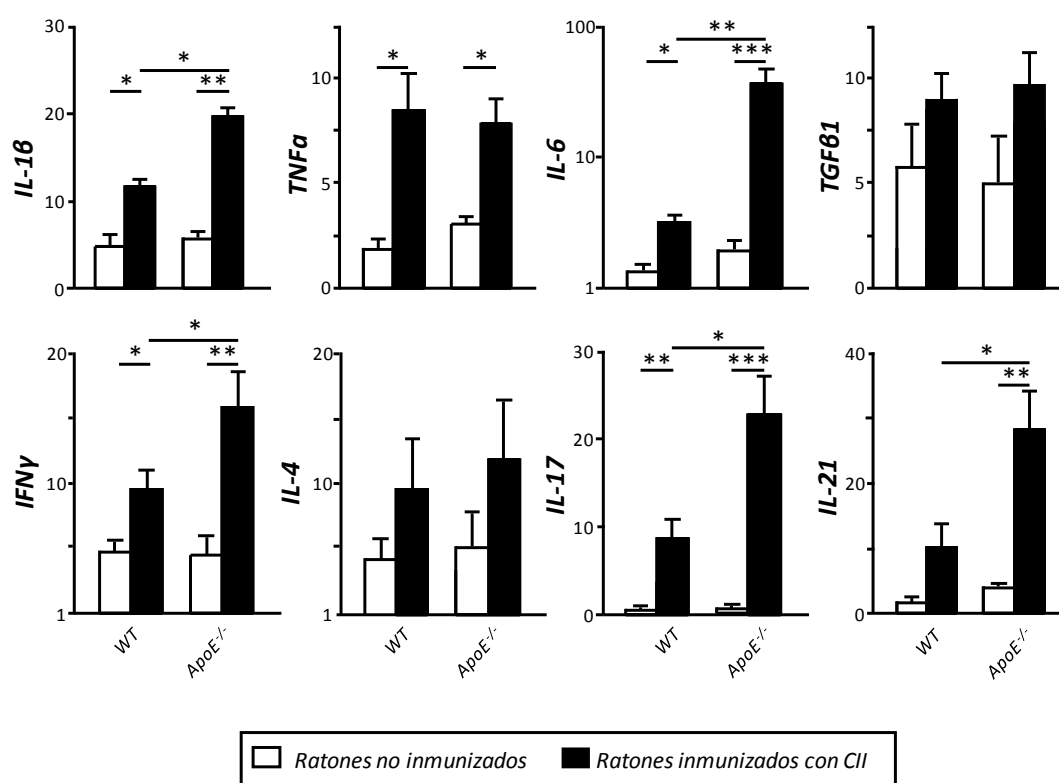


Figura 5: Expresión aumentada de citocinas pro-inflamatorias en las articulaciones de los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de las distintas citocinas en las patas de ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-}, no inmunizados (barras blancas) y 8 semanas post-inmunización (barras negras). Resultados de tres experimentos independientes (15-20 ratones/grupo) expresados como la media $\pm$ SD de la variación de la concentración de cada citocina con respecto a la expresión de GAPDH medida en paralelo en cada muestra. Las diferencias estadísticas se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo.

Dado que observamos diferencias en el patrón de citocinas de los ratones ApoE^{-/-} inmunizados con CII con respecto a los WT, decidimos evaluar si la deficiencia en ApoE modificaba el porcentaje de las distintas subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4⁺ con potencial artritogénico presentes en los ganglios linfáticos tras la inducción de la AIC. Para ello se analizó por citometría de flujo la frecuencia de linfocitos expresando distintos tipos de citocinas intracelulares a partir de células obtenidas de ganglios linfáticos paraaórticos e inguinales de ratones inmunizados con CII. Al comparar los porcentajes de las diferentes subpoblaciones funcionales de células T CD4⁺ en los nódulos linfáticos de los ratones WT y ApoE^{-/-} antes y después de la inmunización con CII-CFA, se observó que las subpoblaciones Th1 (productora de IFN γ) y Th17 (productora de IL-17) estaban aumentadas en los ganglios linfáticos paraaórticos e inguinales de los ratones WT 3 semanas posteriores a la inmunización. En correlación con los resultados obtenidos hasta este momento, este aumento era significativamente mayor (casi el doble) en los ratones ApoE^{-/-}. No se observaron diferencias significativas, en cambio, en el porcentaje de células T reguladoras (Treg) entre los ratones inmunizados y no inmunizados de ambos grupos (Figura 6).

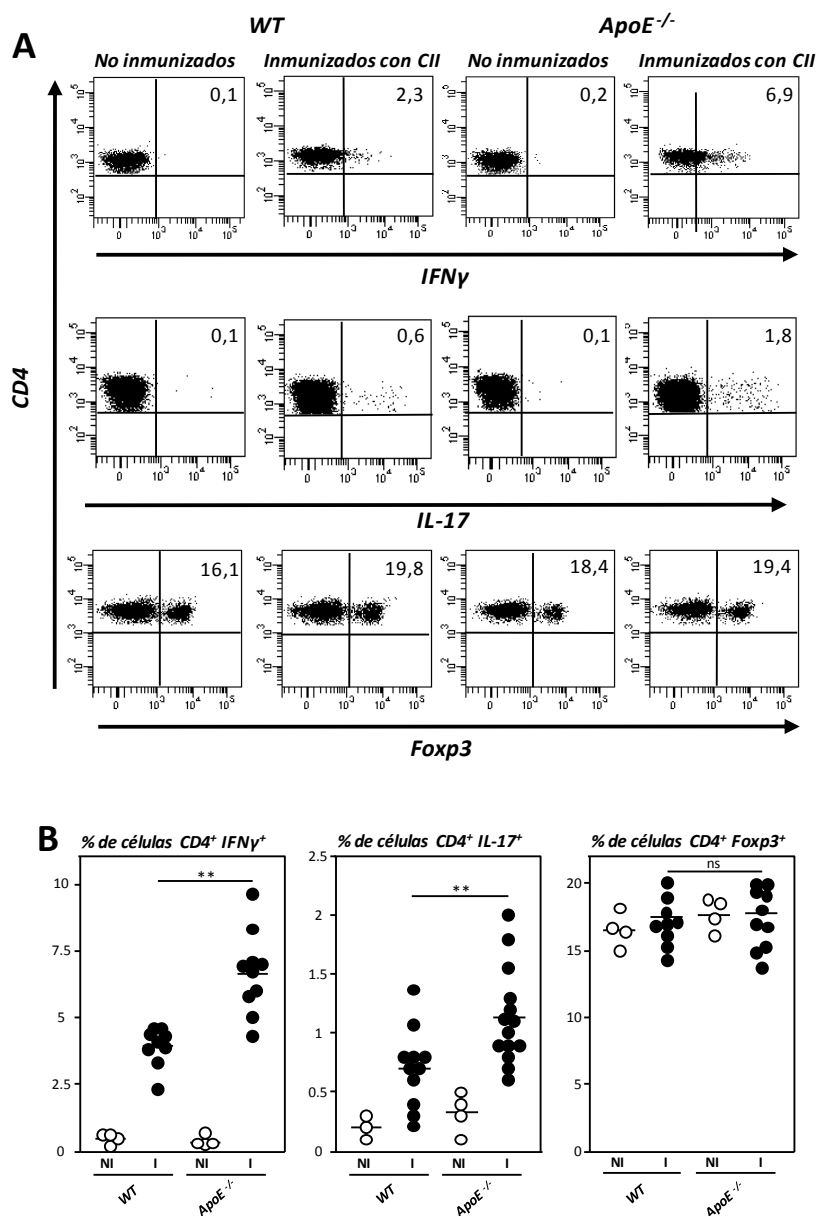


Figura 6: Expansión de células Th1 y Th17, pero no Treg, en los ganglios linfáticos de ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} inmunizados con CII. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad con CII-CFA. Para la tinción de citocinas intracelulares se estimularon los linfocitos de los ganglios paraaórticos 3 semanas después de la inmunización con ionomicina y PMA en presencia de Brefeldina A. **A)** Histogramas representativos de células CD4⁺IFN γ ⁺Th1, CD4⁺IL-17⁺Th17 y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg, determinados por citometría de flujo en los diferentes grupos experimentales. Se indica el porcentaje de cada población. **B)** Porcentajes de células CD4⁺IFN γ ⁺Th1 (panel izquierdo), CD4⁺IL-17⁺Th17 (panel central) y CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg (panel derecho) en ratones no inmunizados (símbolos blancos) y 3 semanas post-inmunización (símbolos negros). Se expresan los valores de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias significativas se expresan como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo. No se observaron diferencias en el número total de células de los ganglios linfáticos entre cada grupo (no inmunizados o inmunizados con CII) entre los ratones B10.RIII.WT y los B10.RIII.ApoE^{-/-}.

5) EL DESARROLLO DE AIC EN RATONES NO EMPEORA LA ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA EN LOS RATONES B10.RIII.ApoE^{-/-}.

Como consecuencia de su incapacidad de producir ApoE, los ratones deficientes en esta proteína son hipercolesterolémicos y desarrollan aterosclerosis de manera espontánea, de un modo dependiente de la edad y de la dieta (*Bobkova et al. 2004*). Esto convierte a los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} en un excelente modelo para estudiar el papel de esta apolipoproteína en dos patologías que se han relacionado estrechamente a lo largo de estos últimos años: la artritis reumatoide y la aterosclerosis.

Nuestro objetivo inicial era evaluar si el desarrollo de una AIC severa en los ratones deficientes en ApoE podría acelerar también la evolución clínica de la aterosclerosis, al igual que ocurre en los pacientes con artritis reumatoide. Se inmunizaron ratones B10.RIII.WT y ApoE^{-/-} con 150 µg de CII emulsionado con CFA en la base de la cola. Se inyectaron también ratones ApoE^{-/-} sólo con PBS-CFA, como controles negativos de AIC. Durante las 10-12 semanas siguientes a la inyección, estos últimos no desarrollaron artritis. A las 8 semanas post-inmunización se realizaron estudios morfométricos en el seno aórtico, los cuales revelaron que la extensión de la lesión aterosclerótica en los ratones ApoE^{-/-} inmunizados con CII era similar a la observada en los ratones ApoE^{-/-} inyectados con PBS-CFA (**Figuras 7A**, paneles izquierdos y **7B**; $p > 0,6$). Los ratones ApoE^{-/-} no inmunizados, en cambio, presentaron unas lesiones ateroscleróticas mucho más severas que los ratones inyectados con PBS-CFA y que los inmunizados con CII-CFA (**Figuras 7A**, paneles izquierdos y **7B**; $p = 0,004$ y $0,002$, respectivamente) y, como era de esperar, no desarrollaron artritis. Por otra parte, por inmunohistoquímica se observó un contenido similar de macrófagos, identificados con el AcM anti-Mac2, en las lesiones ateroscleróticas de los ratones ApoE^{-/-} tratados con PBS-CFA y los inmunizados con CII-CFA (**Figura 7A**, paneles derechos).

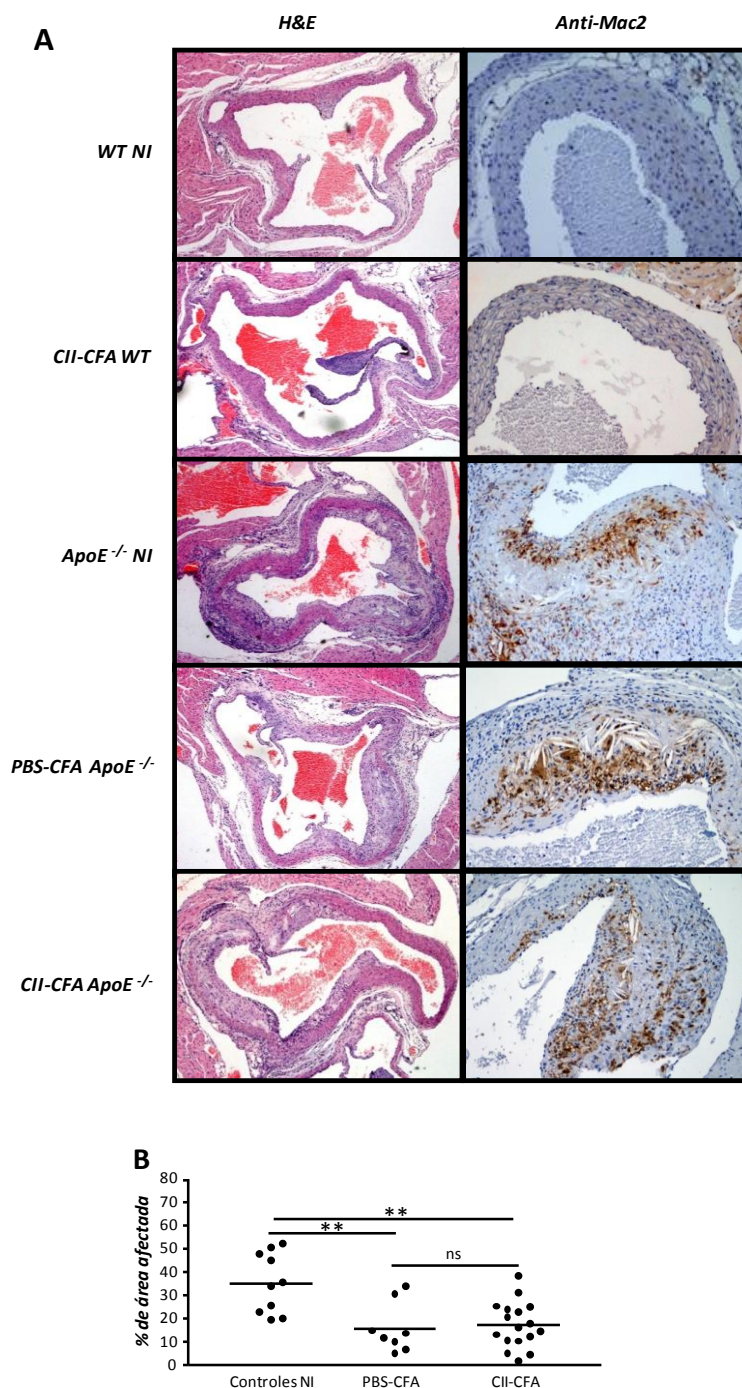


Figura 7: Atenuación de la aterosclerosis como consecuencia de la AIC en ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}. **A)** Aspecto histológico representativo del seno aórtico teñido con hematoxilina y eosina (H&E, paneles izquierdos, x4) y contenido de macrófagos inmunoreactivos a Mac2 en las lesiones ateroscleróticas (paneles derechos, x10) de ratones de la misma edad WT no tratados, WT 8 semanas post-inmunización con CII-CFA, ApoE^{-/-} no tratados, ApoE^{-/-} 8 semanas post-administración de PBS-CFA y ApoE^{-/-} 8 semanas post-inmunización con CII-CFA. **B)** Porcentajes del área afectada determinados por morfometría asistida por ordenador, a partir del porcentaje de área teñida en relación al área ocupada por el ateroma. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes en los diferentes grupos experimentales (8-17 ratones/grupo). Se expresan los valores de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias significativas se expresan como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo.

6) LA PRESENCIA DE UN SOLO ALELO DE ApoE ES SUFICIENTE PARA MANTENER UN PERFIL LIPÍDICO NORMAL.

Como se ha planteado anteriormente, la función de ApoE más estudiada es su participación en el metabolismo lipídico, favoreciendo el transporte reverso de colesterol. Sin embargo, también tiene propiedades anti-inflamatorias (*Lynch et al. 2003, Ali et al. 2005*). Es por ello que debíamos discernir si su participación en el desarrollo acelerado de artritis se debía a su papel en el metabolismo de lípidos, a su rol como molécula inmunomoduladora, o a ambos.

Dado que los ratones deficientes en ApoE tienen niveles muy bajos de HDL y altos niveles de LDL/VLDL, consideramos la posibilidad de que el perfil lipídico pudiera estar influyendo en la aceleración de la AIC. Este aumento en la fracción LDL/VLDL es un factor potencialmente pro-aterogénico (*Weber and Noels 2011*), siendo capaz de inducir un estado pro-inflamatorio en el endotelio vascular, lo cual podría favorecer también al estado pro-inflamatorio sistémico generado por la artritis. Evaluamos entonces el perfil lipídico de los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} y observamos que éste era muy similar al de los ratones WT (**Figura 8A-D**). Sólo observamos una ligera disminución en los niveles de HDL en el suero de los ratones heterocigotos con respecto a los ratones WT. Sin embargo, presentaron niveles similares de colesterol total, LDL/VLDL y triglicéridos (**Figura 8A-D**). Cuando medimos los niveles de ApoE en los tres grupos se puso en evidencia que la concentración plasmática de esta apolipoproteína en los ratones heterocigotos para ApoE es aproximadamente la mitad de los valores encontrados en los animales WT (**Figura 8E**).

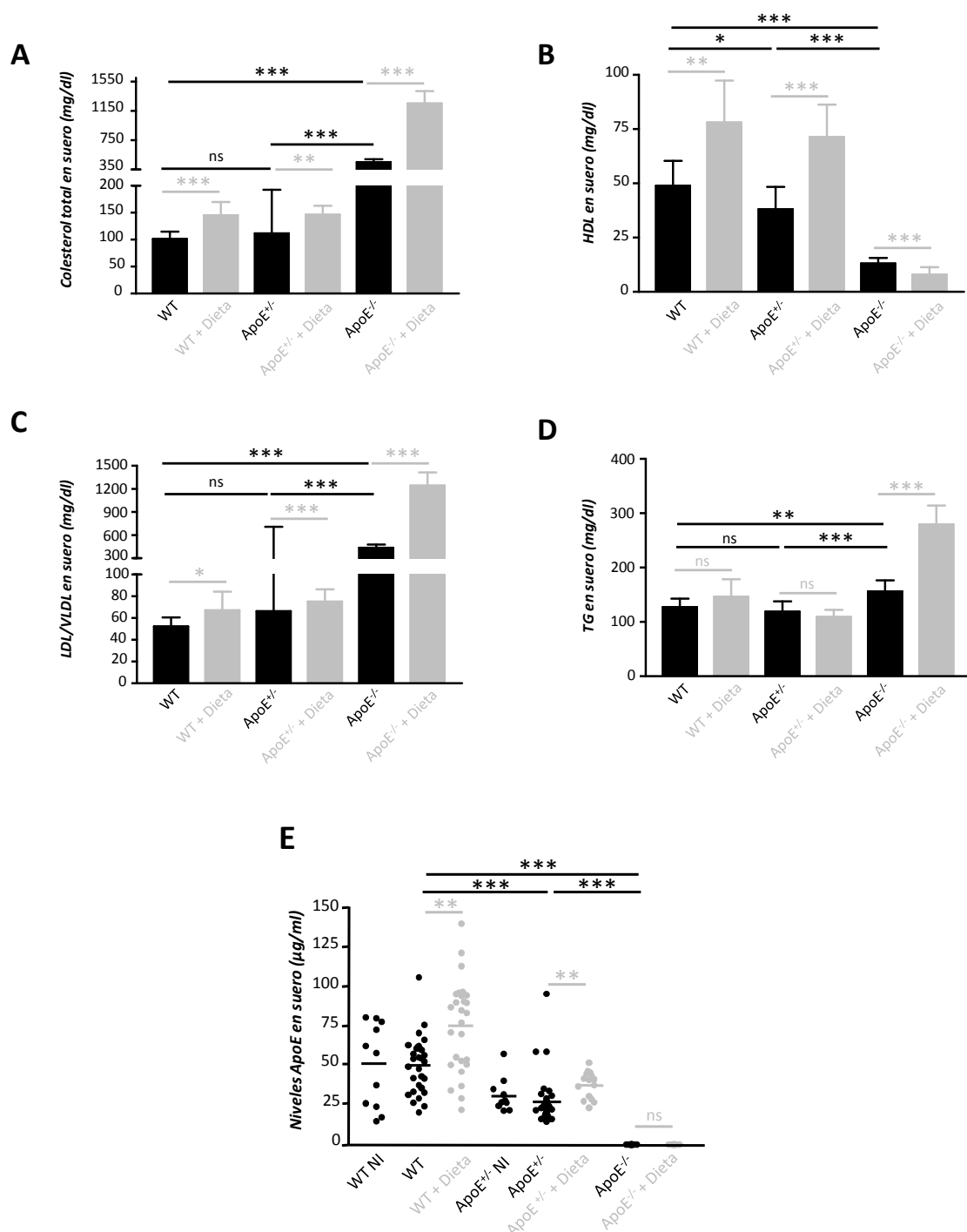


Figura 8: Perfil lipídico en el suero de ratones B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Los niveles de colesterol total (A), HDL (B), LDL/VLDL (C) y triglicéridos (D) fueron medidos en el suero de machos de estas tres estirpes antes y 12 semanas después de la inducción de AIC a través de métodos enzimáticos colorimétricos, mientras que los niveles de ApoE en suero fueron medidos por ELISA (E). Las diferencias estadísticas entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo. Se muestran resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes expresados como la media ± SD (8-15 ratones/grupo). Las columnas mostradas en color gris se abordarán más adelante.

7) LA SEVERIDAD DE LA AIC EN LOS RATONES B10.RIII.ApoE^{+/-} ES MAYOR QUE LA DE LOS RATONES B10.RIII.WT.

Previamente habíamos observado que los ratones ApoE^{-/-} desarrollaban una AIC más severa y acelerada que los ratones WT. Con el fin de determinar qué sucedía en los ratones heterocigotos para ApoE, portadores de una única copia de este gen, comparamos el desarrollo de AIC entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-}. Observamos que, 10-12 semanas después de la inducción de artritis, los ratones ApoE^{+/-} desarrollaban una AIC más rápida y severa que los ratones WT, aunque ligeramente menos severa que la que se desarrollaba en los ratones ApoE^{-/-} (**Figura 9**).

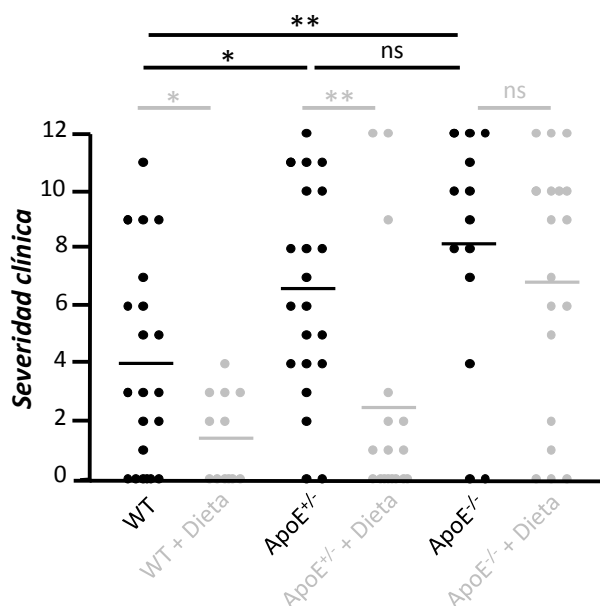


Figura 9: Signos clínicos agravados en ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad con CII-CFA. Severidad clínica de AIC 10-12 semanas post-inmunización con CII-CFA. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes. Se expresa la severidad clínica de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias estadísticas entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo. Las columnas mostradas en color gris se abordarán más adelante.

Esta aceleración de la artritis en los ratones heterocigotos para ApoE se verificó también a nivel radiológico, observándose una mayor incidencia de extremidades con edema, osteopenia yuxtaarticular, erosiones óseas y estrechamiento del espacio articular con respecto a los ratones WT. No se observó diferencia, en cambio, con respecto a los

ratones $ApoE^{-/-}$, aunque los índices radiológicos de las lesiones en los $ApoE^{+/-}$ fueron discretamente inferiores (**Figura 10A y B**).

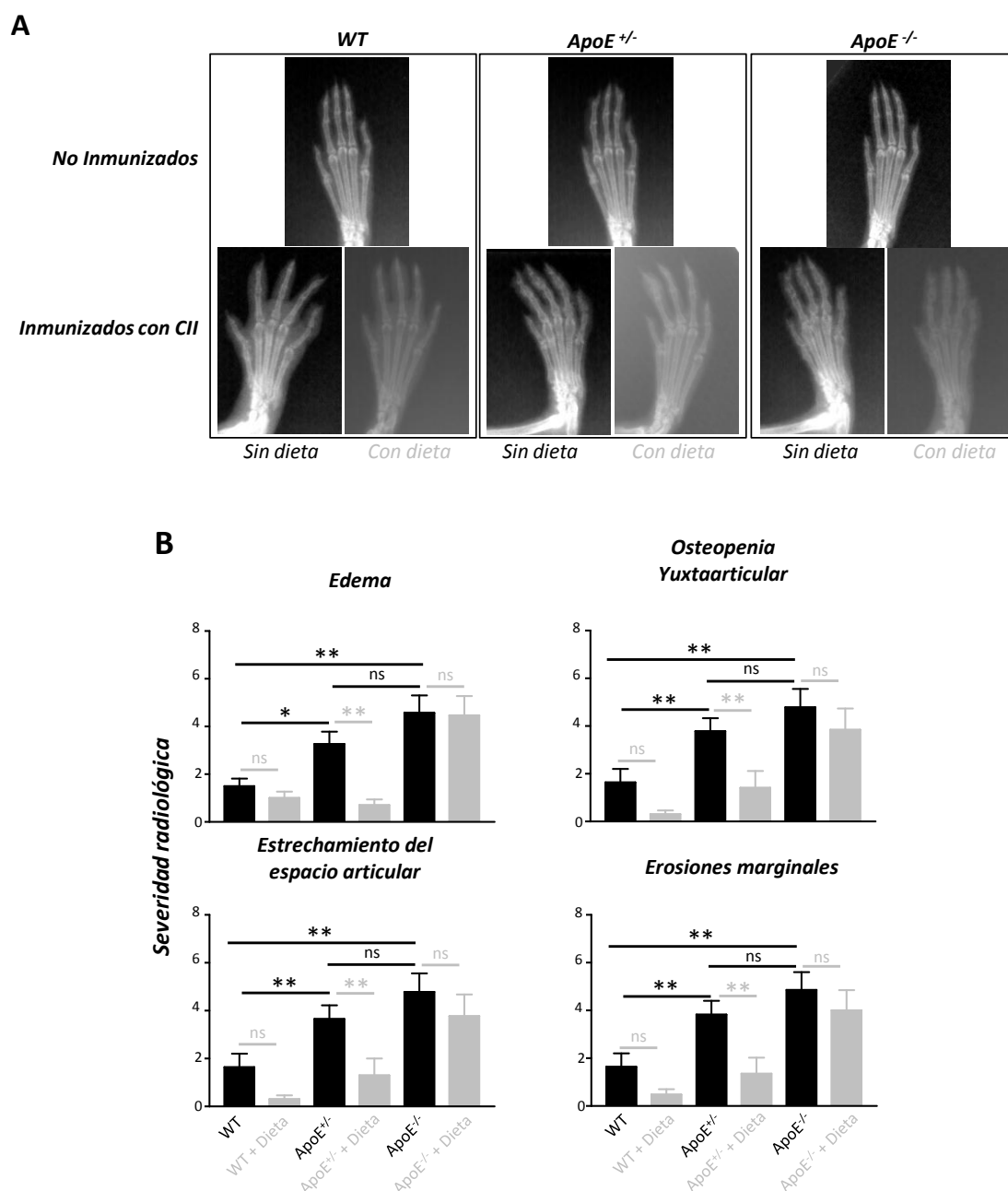


Figura 10: Agravamiento de los signos radiológicos de artritis en los ratones B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ y B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ con respecto a los ratones B10.RIII.WT durante el desarrollo de AIC. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT, B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ y B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ de 8-12 semanas de edad con CII-CFA. **A)** Imágenes radiológicas representativas de las patas traseras de ratones B10.RIII.WT, B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ y B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ no inmunizados y 10-12 semanas post-inmunización. **B)** Severidad radiológica de los cuatro parámetros analizados expresados como la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes (10-15 ratones/grupo). Las diferencias estadísticas entre los ratones de los distintos grupos se indican como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo. Los valores de las columnas mostradas en color gris se comentarán más adelante.

8) LAS PROPIEDADES PRO O ANTI-OXIDANTES DE LAS PARTÍCULAS DE HDL NO INTERVIENEN EN EL AGRAVAMIENTO DE LA AIC EN LOS RATONES B10.RIII.ApoE^{+/-} Y B10.RIII.ApoE^{-/-} RESPECTO A LOS RATONES WT.

Los resultados previos muestran que los ratones heterocigotos para ApoE desarrollan una AIC más acelerada que los ratones WT, a pesar de tener un perfil lipídico similar. Esto argumenta en contra de que la aceleración de la AIC en los ratones deficientes en ApoE (tanto B10.RIII.ApoE^{-/-} como ApoE^{+/-}) sea en parte debida a las alteraciones en su perfil lipídico. No obstante, se buscaron pruebas adicionales que ayudasen a descartar definitivamente esa hipótesis.

En situaciones de inflamación crónica, se sabe que las partículas de HDL, pasan de tener un papel anti-oxidante a tenerlo pro-oxidante (y por ende, pro-inflamatorio) (*Charles-Schoeman et al. 2008*). Es por ello que nos planteamos analizar si las HDL en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} y ApoE^{+/-} podían ser más pro-oxidantes (y pro-inflamatorias) que en los ratones WT. Con el fin de determinar si la presencia de uno o dos alelos de ApoE influye en la capacidad anti-oxidante de la HDL en condiciones pro-inflamatorias, como es el caso de la AIC, se llevaron a cabo ensayos de oxidación utilizando mezclas de sueros de ratones de los distintos grupos experimentales: WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-}, obtenidos a las 10-12 semanas de la inmunización con CII. Estos estudios se hicieron en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Blanco Vaca (Hospital Sant Pau, Barcelona). Cuando realizamos el ensayo poniendo la misma cantidad de HDL de cada grupo, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad anti-oxidante de la HDL purificada de las diferentes mezclas, lo cual podría estar indicando que la presencia de uno o ambos alelos de ApoE no influye en el potencial anti-oxidante de la HDL (**Figura 11A**, $p = 0,145$). Sin embargo, el ensayo de oxidación se realiza igualando la cantidad de fosfolípidos de HDL en todos los grupos, para tener un parámetro de referencia. Pero esto no es lo que se encuentra a nivel fisiológico, donde hay entre 2-3 veces menos HDL en el suero de los ratones ApoE^{-/-}. Por esta razón el ensayo se repitió en condiciones fisiológicas (poniendo 2-3 veces menos de HDL en el grupo ApoE^{-/-}). En estas condiciones, sólo se observó una menor protección (aunque no era estadísticamente significativa) frente a la oxidación en el

grupo de los ratones ApoE^{-/-}, mientras que dicha capacidad de protección era similar entre los ratones WT y los ApoE^{+/-} (**Figura 11B**, $p = 0,136$).

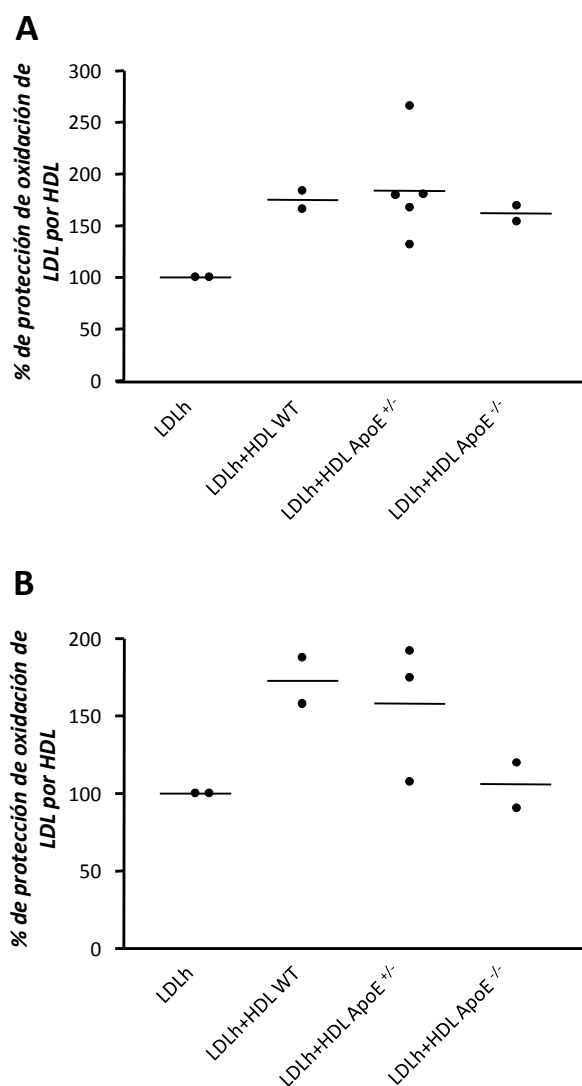


Figura 11: Estudio de las propiedades anti-oxidantes de las partículas de HDL sobre las moléculas de LDL. Se hicieron mezclas de sueros de 4-6 machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} 10-12 semanas después de la inmunización con CII-CFA. Se purificó HDL a partir de estas mezclas por ultracentrifugación secuencial y se incubó con LDL humana en condiciones oxidantes a 37°C por 3 horas. Se midió la formación de dienos conjugados por espectrofotometría y se calculó el porcentaje de protección de oxidación de las moléculas de LDL. **A)** Porcentaje de protección de la oxidación obtenido incubando iguales cantidades de HDL en todos los grupos. **B)** Porcentaje de protección de la oxidación obtenido incubando 2-3 veces menos de HDL en el grupo de los ratones ApoE^{-/-} (condiciones fisiológicas). No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio.

Otra manera de medir la capacidad pro o anti-inflamatoria de la HDL es a través del análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes que la componen, entre las que se encuentran la paraxonasa 1 (PON1) y la enzima acetilhidroxilasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH) (De Geest et al. 2000). Otros autores han descrito que la actividad de estas enzimas antioxidantes se ve modificada en situaciones inflamatorias (Durrington, Mackness and Mackness 2001). Cuando medimos la actividad de estas dos enzimas en los sueros de nuestros ratones, observamos que había una disminución estadísticamente significativa de la actividad de la PAF-AH en la fracción HDL en los ratones heterocigotos y deficientes en ApoE. La actividad de la PON1, en cambio, sólo se vio disminuida de manera estadísticamente significativa en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} (Figura 12).

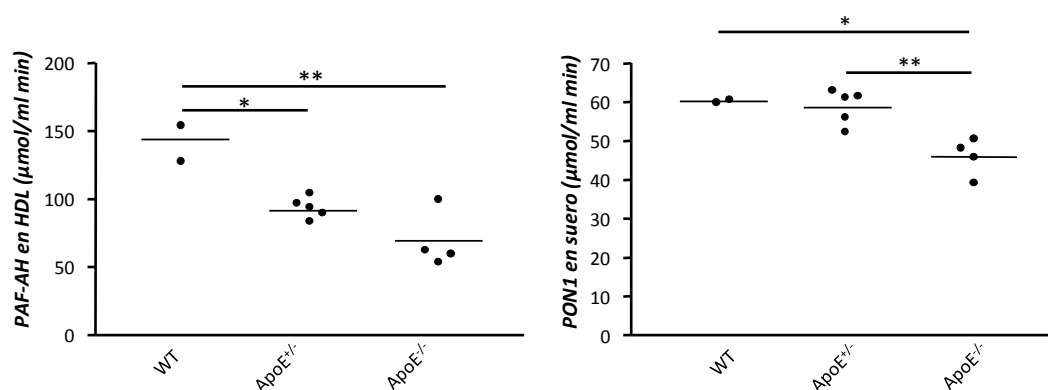


Figura 12: Estudio de la actividad de las enzimas anti-oxidantes de las partículas de HDL. Se hicieron mezclas de los sueros de 4-6 machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} 10-12 semanas después de la inmunización con CII-CFA. Se evaluó la actividad de las enzimas PAF-AH en HDL (purificada por ultracentrifugación secuencial) y PON1 en suero a través de kits comerciales. El análisis estadístico de las diferencias entre los ratones de los distintos grupos se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo.

9) EFECTO DE LA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y LA EVOLUCIÓN DE LA AIC.

9.1) La administración de una dieta hipercolesterolémica sólo produce un ligero aumento en la colesterolemia en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-}, afectando severamente a los B10.RIII.ApoE^{-/-}.

Dado que los ratones ApoE^{-/-}, respecto a los ratones WT, presentaban dislipidemia en asociación con un agravamiento de la artritis, decidimos evaluar si aumentando el estado de dislipidemia, empeoraba aún más el cuadro clínico. Para ello, los ratones deficientes en ApoE fueron alimentados con una dieta hipercolesterolémica (dieta HC) tras la inmunización con CII.

Con el fin de determinar cuánto influía la presencia de uno o ambos alelos de ApoE para mantener valores normales de colesterol y la proporción de las distintas fracciones de lipoproteínas, analizamos el perfil lipídico completo de ratones a los que se les había inducido artritis 12 semanas antes, y a los que se les había administrado dieta HC. Observamos que la administración de dieta aumentó los niveles circulantes de colesterol total y LDL/VLDL en los tres grupos de ratones utilizados, si bien de manera más marcada en los ratones ApoE^{-/-}. También se puso en evidencia un incremento muy marcado en los niveles de HDL en los ratones WT y ApoE^{+/-}, mientras que los ratones deficientes en ApoE sufrieron una disminución en dichos niveles. Los niveles de triglicéridos, en cambio, sólo mostraron un aumento significativo tras la administración de la dieta HC en los ratones ApoE^{-/-} (**Figura 13A-D**).

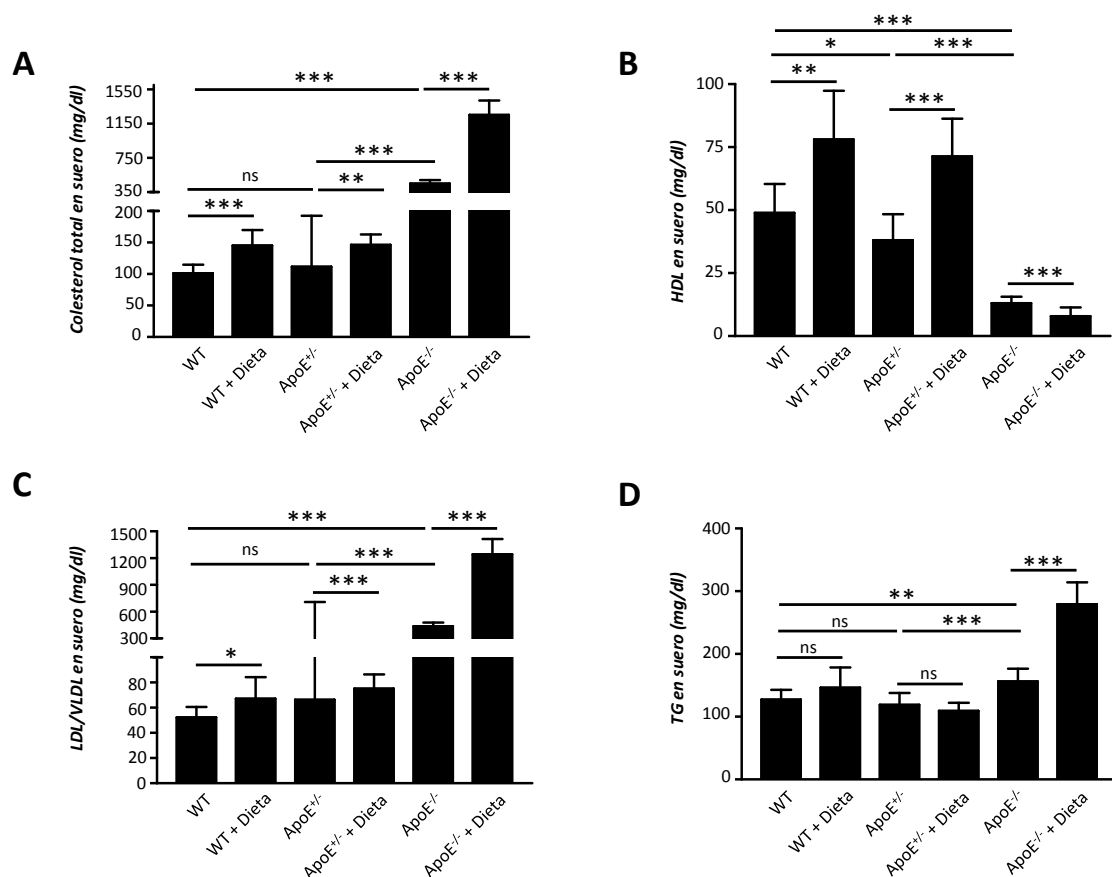


Figura 13: Perfil lipídico en el suero de ratones B10.RIII.WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Los niveles de colesterol total (A), HDL (B), LDL/VLDL (C) y triglicéridos (D) fueron medidos en el suero de machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} 12 semanas posteriores a la inducción de AIC y tras la administración de una dieta hipercolesterolémica. Las diferencias estadísticas entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo. Se muestran resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes expresados como la media $\pm$ SD (8-15 ratones/grupo).

9.2) La dieta hipercolesterolémica disminuye la severidad de la AIC en los ratones B10.RIII.WT y los B10.RIII.ApoE^{+/-}, pero no en los B10.RIII.ApoE^{-/-}.

A diferencia de los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}, los cuales presentan un claro estado de dislipidemia, los ratones B10.RIII.WT y los ApoE^{+/-} tienen prácticamente el mismo perfil lipídico normal. Sin embargo, el nivel de ApoE circulante en los ratones heterocigotos es casi la mitad del que tienen los ratones WT. Cuando evaluamos el efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre el desarrollo de artritis observamos que, al contrario de lo esperado, este tipo de alimentación disminuyó la severidad de la artritis en los ratones WT y ApoE^{+/-}. En cambio, en los ratones ApoE^{-/-} la dieta hipercolesterolémica no modificó la severidad de la AIC (Figura 14).

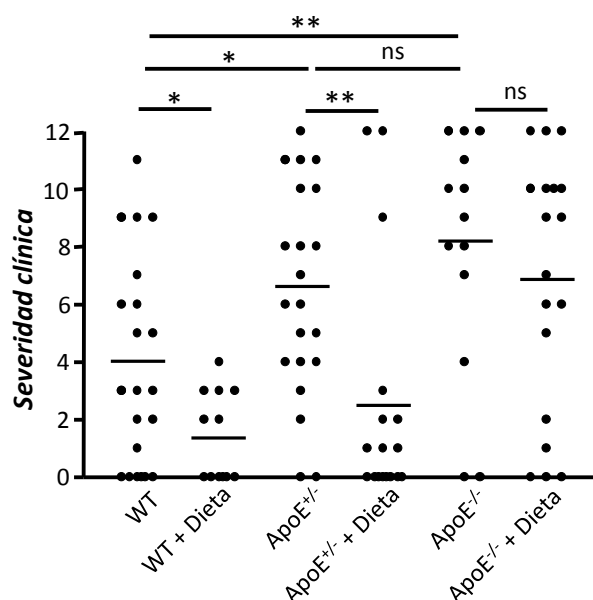


Figura 14: Influencia de la dieta hipercolesterolémica sobre el desarrollo de AIC. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad con CII-CFA, y a algunos grupos se les administró una dieta rica en colesterol. Se muestra la severidad clínica de AIC 10-12 semanas post-inmunización con CII-CFA. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes. Se expresa la severidad clínica de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias significativas se expresan como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo.

Cuando se valoró la artritis desde el punto de vista radiológico, se observó un paralelismo con la mejoría observada en la exploración clínica de la AIC en los ratones WT y heterocigotos para ApoE tras la administración de una dieta HC. De esta manera, los ratones WT inmunizados con CII-CFA mostraron una clara mejoría, presentando un ligero edema, una reducción en la presencia de osteopenia, erosiones marginales y estrechamiento del espacio yuxtaarticular (si bien esta reducción no alcanzó a ser estadísticamente significativa). Los ratones ApoE^{+/-} mostraron también una reducción en el grado de inflamación tisular, un menor estrechamiento del espacio articular, una reducción de la osteopenia yuxtaarticular y una menor presencia de erosiones marginales con respecto a los ratones heterocigotos a los que no se les había administrado dieta HC, si bien dicha mejoría no fue tan evidente como en el grupo de los ratones WT (**Figura 15A y B**).

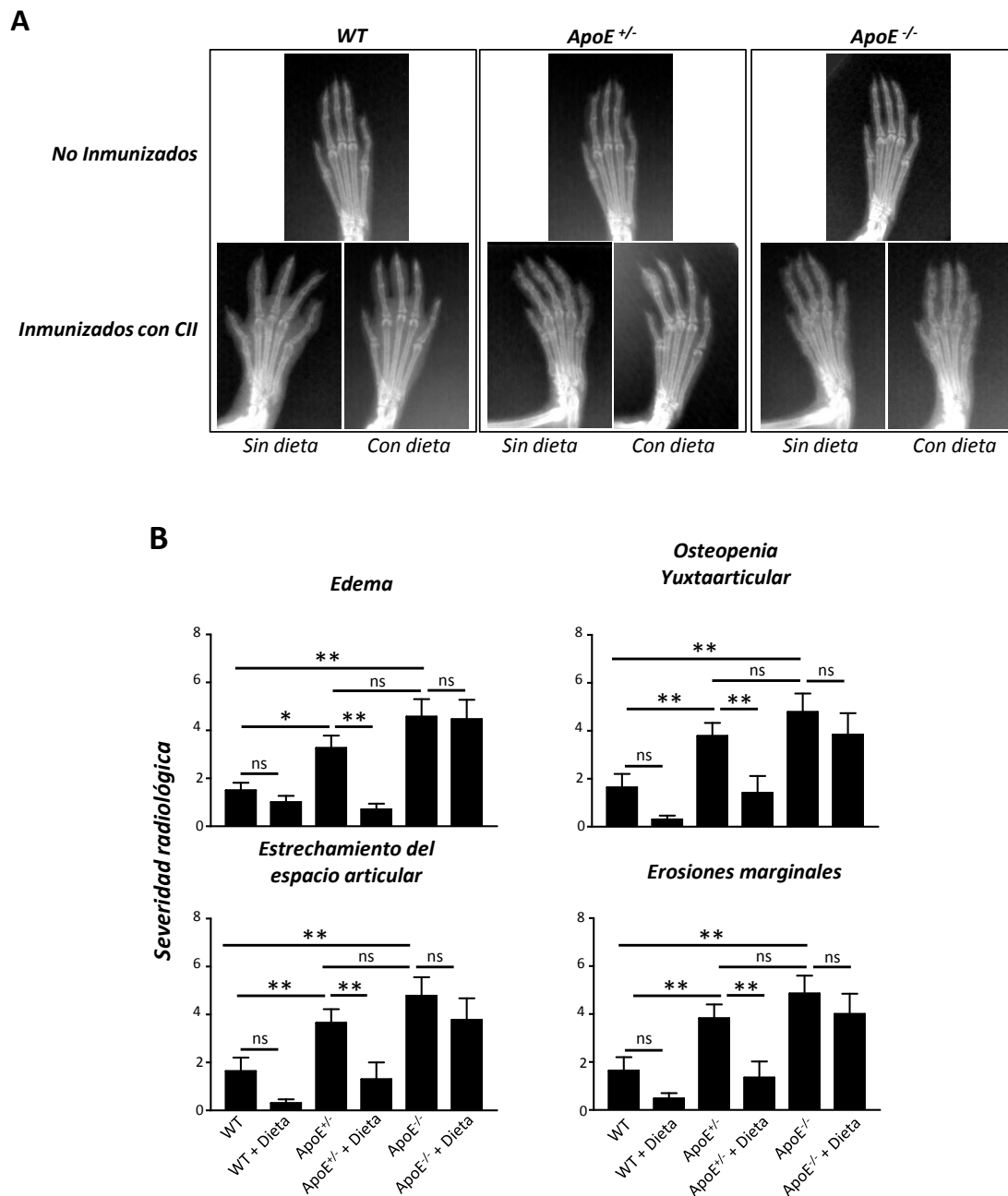


Figura 15: Mejoría de los signos radiológicos de artritis en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-} durante el desarrollo de AIC. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad con CII-CFA. A algunos grupos se les administró una dieta rica en colesterol. **A)** Imágenes radiológicas representativas de las patas traseras de ratones B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} no inmunizados y 10-12 semanas post-inmunización, con y sin dieta **B)** Severidad radiológica de los cuatro parámetros analizados expresados como la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes (10-15 ratones/grupo). Las diferencias estadísticas entre los ratones de los distintos grupos se indican como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo.

10) EL EFECTO BENEFICIOSO DE LA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA EN LA AIC DE LOS RATONES B10.RIII.WT Y B10.RIII.ApoE^{+/-} SE CORRELACIONA CON UN AUMENTO EN LOS NIVELES DE ApoE CIRCULANTES.

Nos habíamos planteado que la reducción en la severidad de la AIC tras la administración de una dieta hipercolesterolémica podía deberse a una respuesta adaptativa al exceso de colesterol, manifestada por un incremento en los niveles de ApoE. Para verificar si se habían modificado los niveles de ApoE en circulación, se midieron por ELISA los niveles de esta apolipoproteína en suero de ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} inmunizados con CII-CFA, alimentados con dieta normal o dieta HC, 12 semanas después de la inducción de artritis. Los resultados muestran claramente que la dieta HC induce un aumento significativo en los niveles de ApoE circulante tanto en los ratones WT como en los ratones ApoE^{+/-}, en estrecha correlación con el descenso en la severidad de la AIC (Figura 16).

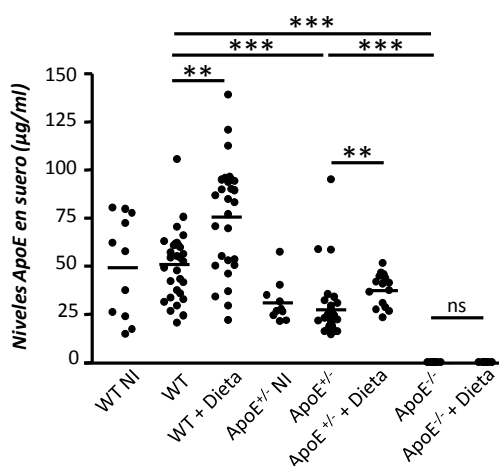


Figura 16: Niveles de ApoE en el suero de ratones B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Los niveles de ApoE fueron medidos en el suero de machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} antes y 12 semanas posteriores a la inducción de AIC mediante ELISA. Se expresan los valores de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias estadísticas entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo. Se muestran resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.

11) LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA MODIFICA EL PATRÓN DE RESPUESTA DE ANTICUERPOS anti-CII EN LOS RATONES B10.RIII.WT Y B10.RIII.ApoE^{+/-} INMUNIZADOS CON CII.

Dado que inicialmente habíamos observado que la inducción de artritis con CII modificaba la respuesta de anticuerpos dirigidos contra este antígeno en ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}, decidimos estudiar qué sucedía en ratones heterocigotos para ApoE. Por otra parte, dado que hasta el momento habíamos observado que la dieta HC tiene un efecto protector sobre el desarrollo y la severidad de la AIC en los ratones B10.RIII.WT y ApoE^{+/-} (sin verse afectados los ratones ApoE^{-/-}), quisimos valorar cuál era el efecto de dicha dieta sobre la respuesta inmune humoral anti-CII. Comparamos para ello los niveles de anticuerpos anti-CII generados a través de la valoración de los subtipos IgG₁ e IgG_{2a} por ELISA. Observamos que todos los grupos de ratones desarrollaron fuertes respuestas humorales anti-CII a las 8-12 semanas de la inmunización. Los niveles de IgG_{2a}, si bien no mostraron diferencias significativas entre los tres genotipos en estudio, evidenciaron una disminución estadísticamente significativa tras la administración de la dieta rica en colesterol. Esto se observó tanto en el grupo de los ratones WT como en los heterocigotos, sin verse afectados los niveles de IgG_{2a} en los ratones ApoE^{-/-} (**Figura 17A**). Estos datos se correlacionan con el efecto protector de la dieta sobre el desarrollo de AIC descrito anteriormente para los ratones portadores de una o dos copias del gen de ApoE. A diferencia de lo observado en experimentos anteriores, en este estudio los niveles de IgG₁ fueron similares entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-}, y no mostraron diferencias estadísticamente significativas tras la administración de una dieta HC (**Figura 17B**).

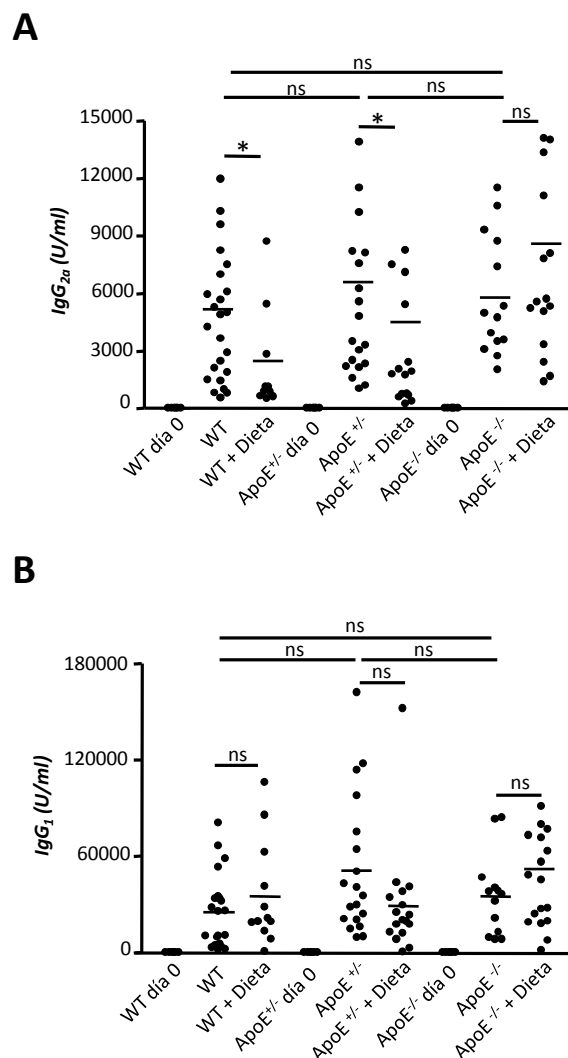


Figura 17: Respuestas de anticuerpos anti-CII alteradas en ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-} durante el desarrollo de AIC tras la administración de una dieta rica en colesterol. Se inmunizaron machos B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} de 8-12 semanas de edad con CII-CFA. A algunos grupos se les administró una dieta hipercolesterolémica. Niveles en suero de anticuerpos anti-CII IgG_{2a} (**A**) e IgG₁ (**B**) antes y 8-12 semanas después de la inmunización con CII-CFA determinados por ELISA. Se expresan los valores de cada ratón. Las barras representan el valor medio de dichos valores. Las diferencias estadísticas entre los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo. Se muestran resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.

12) LOS RATONES B10.RIII.ApoE^{+/-} Y LOS B10.RIII.ApoE^{-/-} MUESTRAN UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS EN LAS ARTICULACIONES, PERO LA DIETA RICA EN COLESTEROL NO MODULA DICHO PATRÓN.

En vista de nuestros resultados previos, que mostraban un efecto modulador de la dieta hipercolesterolémica sobre el desarrollo de AIC en ratones B10.RIII.WT y ApoE^{+/-}, y sumado al hecho de que los ratones heterocigotos y deficientes para ApoE desarrollan una AIC más severa y acelerada, decidimos evaluar el patrón de expresión de citocinas en las articulaciones de estos ratones durante la AIC. Para ello se extrajo el ARN de las patas de ratones inmunizados con CII emulsionado con CFA, y se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de expresión de las citocinas artritogénicas IL-1 β , TNF α e IL-6. Observamos un aumento en la expresión de IL-1 β , TNF α e IL-6 en las articulaciones de los ratones B10.RIII.WT 10-12 semanas después de la inducción de artritis (**Figura 18**). Los niveles de ARN_m de IL-1 β e IL-6 aumentaron de manera más marcada en los ratones ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} tras la inducción de AIC con respecto a los WT (**Figura 18**). Esto se correlaciona con la mayor severidad de la artritis observada en dichos ratones. Los niveles de expresión de los transcritos para TNF α , en cambio, no se vieron modificados entre los distintos genotipos en estudio tras la inducción de artritis (**Figura 18**).

Cuando se comparó el efecto de la dieta HC sobre el patrón de expresión de las citocinas pro-inflamatorias estudiadas, se observó que ésta no ejercía ningún efecto sobre el mismo (**Figura 18**). Sólo se observó un aumento con respecto al nivel basal de IL-1 β , TNF α e IL-6 presente en los ratones WT, ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} no inmunizados, pero no hubo diferencias en la expresión de las citocinas entre los ratones inmunizados con y sin dieta HC (**Figura 18**).

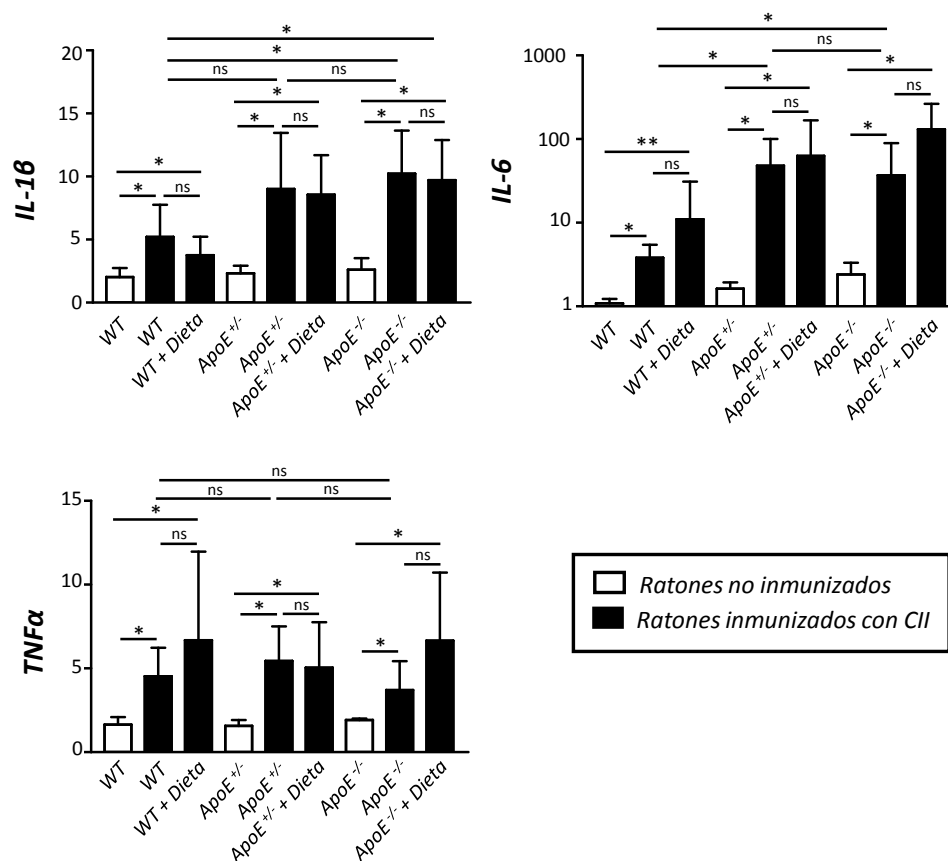


Figura 18: Expresión aumentada de citocinas pro-inflamatorias en las articulaciones de los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} durante el desarrollo de AIC. Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de las distintas citocinas en las patas de ratones B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-}, no inmunizados (barras blancas) y 10-12 semanas post-inmunización (barras negras), a algunos de los cuales se les había administrado una dieta rica en colesterol. Resultados de dos o tres experimentos independientes (8-10 ratones/grupo) expresados como la media $\pm$ SD de la variación de la concentración de cada citocina con respecto a la expresión de GAPDH medida en paralelo en cada muestra. Las diferencias estadísticas se indican como: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: no significativo.

Discusión

DISCUSIÓN

El desarrollo de aterosclerosis acelerada en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide ponen de manifiesto la estrecha relación existente entre las enfermedades autoinmunes y los mecanismos reguladores del metabolismo lipídico. Por un lado, cada vez hay más unanimidad a la hora de incluir a la aterosclerosis dentro del espectro de las enfermedades autoinmunes, habida cuenta de la presencia de elementos de la inmunidad innata y adaptativa en las lesiones ateroscleróticas y de la frecuente aparición de accidentes vasculares agudos en el transcurso de enfermedades infecciosas, las cuales se caracterizan por la activación de potentes respuestas inmunitarias (*Frostegard 2005, Gomez-Guerrero, Mallavia and Egido 2011*). Por otro lado, se ha constatado que los trastornos del metabolismo lipídico, y en concreto la obesidad como su manifestación principal, son un factor agravante del curso clínico de los procesos autoinmunes (*Stavropoulos-Kalinoglou et al. 2011, Stavropoulos-Kalinoglou et al. 2012*). Por el contrario, las dietas hipocalóricas se acompañan de una evolución clínica más favorable de estos procesos (*Iwashige et al. 2004, Klack, Bonfa and Borba Neto 2012*).

Los resultados presentados en el presente trabajo refuerzan la idea de esta asociación entre inflamación y alteraciones en el metabolismo lipídico. Básicamente, los datos aportados aquí muestran que la deficiencia en **ApoE**, una apolipoproteína clave en el metabolismo del colesterol, predispone al desarrollo de una forma clínica muy severa de artritis inducida por colágeno en ratones. Este empeoramiento del curso clínico guarda relación con la deficiencia parcial o total en ApoE, de tal forma que el agravamiento de la AIC, con respecto a los ratones con niveles normales de esta apolipoproteína, fue estadísticamente significativo tanto en los animales homocigotos para el déficit (ApoE^{-/-}) como en los heterocigotos (ApoE^{+/-}), que mantienen unos niveles de ApoE en suero alrededor del 50% de los encontrados en los ratones normales. Este juicio clínico se sustenta en tres pilares: (a) la valoración de los hallazgos exploratorios de las extremidades mediante la aplicación de un *score* clínico; (b) el análisis cuantitativo de cuatro parámetros radiológicos; y (c) el estudio anatomopatológico de las pequeñas articulaciones de las extremidades de los animales con AIC.

Coincidiendo temporalmente con nuestros experimentos, Asquith y colaboradores mostraron una resistencia en los ratones ApoE^{-/-} al desarrollo de AIC, en comparación con los ratones WT (Asquith *et al.* 2010). La única explicación razonable para esta discordancia es el empleo de condiciones diferentes en la puesta en marcha del modelo de AIC. Así, Asquith y colaboradores utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 (H-2^b), en lugar de los B10.RIII (H-2^r) nuestros, y el colágeno de tipo II que emplearon fue de pollo, en tanto que el nuestro fue bovino. Es conocido que en las condiciones empleadas por el grupo de Asquith la severidad e incidencia de la artritis que se desarrolla tras la inmunización es mucho menor que cuando se sigue el protocolo descrito en el presente trabajo (Asquith *et al.* 2010).

Este agravamiento clínico de la AIC en los ratones deficientes en ApoE puede atribuirse a dos posibles mecanismos, los cuales no tienen que ser mutuamente excluyentes. Articularemos la discusión de nuestros resultados alrededor de estos dos mecanismos. El primero es la posible modulación de la respuesta inflamatoria impuesta por las alteraciones del perfil lipídico que hemos observado en los ratones con déficit de ApoE circulante. El segundo mecanismo patogénico es el posible efecto directo de la propia ApoE sobre la respuesta inmunitaria, modulando la activación del sistema inmune en el transcurso de la reacción autoinmune desencadenada por la inmunización con colágeno de tipo II en una cepa susceptible a AIC, como la B10.RIII. En ambos casos, la utilización de una dieta hipercolesterolémica, con la cual hemos alterado aún más el disbalance lipídico, nos ha permitido obtener resultados adicionales que nos han ayudado a interpretar la patogenia del fenómeno.

Efecto del perfil lipídico sobre la evolución de la AIC

Los ratones ApoE^{-/-} presentan un desequilibrio en la concentración sérica de los distintos parámetros que definen el perfil lipídico de estos animales. Entre otras alteraciones, destaca una tendencia a la disminución en los niveles plasmáticos de HDL y un marcado ascenso en los niveles circulantes de LDL/VLDL y colesterol, con respecto a los ratones normales (WT). En la actualidad existe una abundante bibliografía que nos ayuda a elaborar una hipótesis sobre la posible influencia de este perfil lipídico alterado sobre la respuesta inmune y, como consecuencia, en el agravamiento de la evolución clínica de la AIC en los ratones ApoE^{-/-}.

La activación del sistema inmunitario está muy condicionada a la percepción de una serie de señales de peligro que pueden venir tanto del exterior del organismo como de los tejidos y células propios. Estas señales de alarma son patrones moleculares peculiares, conocidos como **PAMPs** (*pathogen associated molecular patterns*) y **DAMPs** (*danger associated molecular patterns*). La unión de estas moléculas a sensores existentes en las membranas o el citosol de las células presentadoras de antígeno, sobre todo las células dendríticas, provoca la activación y la maduración funcional de las mismas, posibilitando un fenómeno clave en el funcionamiento de la respuesta inmune: la conexión entre el sistema inmune innato y el adaptativo (Piccinini and Midwood 2010, Kumar, Kawai and Akira 2011a). Dentro del amplio grupo de DAMPs endógenos se encuentran los cristales de colesterol y las partículas de LDL y VLDL, cuyo efecto sobre la activación de la respuesta inmune es máximo cuando están oxidadas (Dewell et al. 2010, Liu et al. 2012), algo habitual en situaciones de inflamación sistémica. El aumento en las fracciones LDL/VLDL, al ser pro-aterogénicas, induce además un estado pro-inflamatorio en el endotelio vascular, lo cual incrementaría aún más el ambiente pro-inflamatorio sistémico o generalizado provocado por la artritis (Dessein et al. 2002, Full, Ruisanchez and Monaco 2009). Por otro lado, se ha demostrado recientemente que los cristales de colesterol activan el inflamasoma de NLRP3, un sensor citosólico de peligro, existente en los fagocitos de la inmunidad innata. La activación del mencionado inflamasoma completa la activación de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β y la IL-18 y posibilita su secreción al compartimento extracelular (Dewell et al. 2010). Igualmente, si se inyectan por vía intraperitoneal cristales de colesterol se induce una inflamación local aguda, que puede evitarse si se emplean ratones deficientes en cualquiera de las siguientes moléculas: NLRP3, cathepsina B, cathepsina L o IL-1 β (Dewell et al. 2010). Resultados similares se obtienen al utilizar LDL oxidadas (Liu et al. 2012). Por lo tanto, la alteración en los niveles plasmáticos de estas partículas lipídicas, provocada por la ausencia de ApoE circulante, podría potenciar la respuesta inmune, a la manera de un sistema adyuvante. De hecho, las sales de aluminio, empleadas como adyuvante en diferentes estrategias de vacunación, potencian también la respuesta inmune a través de la activación del inflamasoma de NLRP3 (Li et al. 2008a). Finalmente, hay que mencionar que la activación de este inflamasoma es el mecanismo propuesto para explicar la activación de la respuesta inmune en la artritis gotosa, dada la capacidad de los microcristales de ácido úrico de activar este mecanismo de alarma de la respuesta inmune innata (Liu-Bryan 2010). Por lo tanto, este incremento en los niveles de

LDL y VLDL podría estar potenciando la respuesta inmune en los ratones ApoE^{-/-} y provocando en ellos una artritis más severa.

Sin embargo, en nuestro estudio hemos empleado también ratones heterocigotos B10.RIII.ApoE^{+/-} (cuyo nivel de ApoE circulante es aproximadamente la mitad del de los WT), los cuales presentan un perfil lipídico muy similar al de los ratones B10.RIII.WT, salvo una ligera disminución en los niveles de HDL, resultados que coinciden con los anteriormente descritos por Bobková y colaboradores (*Bobkova et al. 2004*). Sin embargo, la artritis que desarrollaron los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} inmunizados con CII fue significativamente más severa y acelerada que la de los ratones B10.RIII.WT, estando los índices de severidad muy próximos a los observados en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}. Esta apreciación clínica se corroboró a nivel radiológico, observándose mayor edema, osteopenia yuxtaarticular, estrechamiento del espacio articular y mayor presencia de erosiones marginales que en los ratones WT con AIC. Estos resultados ponen en duda la hipótesis anteriormente expuesta de una correlación de agravamiento de la AIC en los ratones deficientes en ApoE con las alteraciones del perfil lipídico secundarias a la deficiencia en esta apolipoproteína.

No obstante, antes de rechazar completamente esta posibilidad, deberíamos tener también en cuenta el papel de las partículas HDL en el escenario patogénico. Las HDLs se han considerado clásicamente proclives al aclaramiento del colesterol, protectoras de la oxidación de las LDLs y, por lo tanto, inmunomoduladoras. Pero este comportamiento no es general y aplicable a cualquier situación. En el contexto de las enfermedades inflamatorias crónicas al menos una parte de las HDLs se vuelven disfuncionales, convirtiéndose en partículas pro-oxidantes y pro-inflamatorias (*Charles-Schoeman et al. 2008*).

Para analizar el efecto de esta nueva variable sobre la evolución de la AIC hemos llevado a cabo ensayos que nos han permitido evaluar el porcentaje de protección de oxidación de las LDL en presencia de HDL purificadas de ratones B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-}. Estos ensayos se realizaron en dos condiciones experimentales: (1) comparando la actividad de las HDL de estos tres tipos de ratones en presencia de concentraciones equivalentes de estas lipoproteínas, y (2) utilizando las mismas concentraciones de HDL observadas *in vivo* en cada grupo de animales, es decir, del orden de 2-3 veces más bajas en las muestras de los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} que en las procedentes de los ratones WT y ApoE^{+/-}. Estos ensayos demostraron que las HDLs de los

ratones B10.RIII.WT y las de los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} y B10.RIII.ApoE^{+/-} tienen una capacidad de protección de la oxidación de las LDLs similar en todos los casos.

Adicionalmente, se han cuantificado los niveles de PON1 y PAF-AH, dos proteínas características de las HDL. Ambas poseen una actividad enzimática sobre la que se sustenta el poder antioxidante de las HDL. Está descrito que la actividad antioxidante de la PON1 disminuye como resultado de respuestas inflamatorias (*Durrington et al. 2001*). Por ello, para ratificar los resultados anteriores, se procedió a cuantificar la actividad de estas dos enzimas en los sueros de los diferentes grupos de ratones, deficientes o no en ApoE. Así, observamos que había una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la PAF-AH en HDL en los ratones heterocigotos y deficientes en ApoE. Otros investigadores también habían hallado una menor actividad de la enzima PAF-AH en ratones ApoE^{-/-} en comparación con los ratones WT, sólo que en este caso era en la estirpe C57BL/6 (*De Geest et al. 2000*). Cuando estudiamos la actividad de la PON1, en cambio, ésta sólo se vio disminuida de manera significativa en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}.

Se ha reportado que los pacientes con artritis reumatoide tienen reducida la actividad de la PON1 (*Tanimoto et al. 2003*). Una posibilidad es que el menor porcentaje de protección de oxidación de la LDL y la disminución en la actividad de las enzimas PON1 y PAF-AH que observamos en los ratones deficientes en ApoE se deba simplemente al hecho de tener menos partículas de HDL en circulación. Sin embargo, esto es algo complejo de verificar, dado que la actividad anti-inflamatoria de las HDL no siempre se correlaciona con estos parámetros. Habría que evaluar también otros factores como la actividad de la enzima LCAT, la concentración de las apolipoproteínas A-I y A-IV, como así también la concentración de la proteína SAA en las partículas de HDL para tener una absoluta certeza de que la función de ApoE como modulador del metabolismo lipídico modifica o no la evolución de la AIC.

A pesar de esto, la mayoría de las evidencias con las que contamos hasta el momento disminuyen notablemente la posibilidad de que las alteraciones en el perfil lipídico o las propiedades pro o anti-inflamatorias de las partículas de HDL sean la causa de la aceleración de la artritis en los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} inmunizados con CII.

ApoE como modulador de la inflamación

La capacidad de ApoE de modular al sistema inmunitario es conocida desde hace tres décadas (Hui *et al.* 1980, Mahley *et al.* 1984). La mayor parte de los mecanismos desvelados hasta ahora sobre el efecto de ApoE sobre la respuesta inmune se centran en su acción sobre elementos de la respuesta inmune innata. En este sentido, Lynch y colaboradores utilizaron *in vivo* COG133, un péptido de ApoE correspondiente a la región de unión a su receptor (Lynch *et al.* 2003). La administración de este péptido en ratones inyectados con endotoxina bacteriana (LPS), consiguió prevenir la producción de altos niveles de citocinas pro-inflamatorias, como TNF α e IL-6, tanto a nivel sistémico como en el cerebro (Lynch *et al.* 2003). A raíz de ello, Ali y colaboradores postularon que ApoE regula la producción de citocinas pro-inflamatorias a nivel del ARN, dado que observaban un aumento en sus niveles en hígado y bazo en ratones deficientes en ApoE tratados con LPS (Ali *et al.* 2005).

ApoE es un regulador de la plasticidad de los monocitos y los macrófagos (Raffai 2012). Mediante señales dispensadas sobre los receptores de la membrana de estas células, ApoE puede influenciar la polaridad de los macrófagos, inhibiendo su variante pro-inflamatoria (M1), caracterizada por la producción de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Baitsch *et al.* 2011). Al mismo tiempo, ApoE es capaz de estimular el fenotipo M2 anti-inflamatorio, caracterizado fenotípicamente por una mayor actividad de la enzima arginasa-1 (Baitsch *et al.* 2011). ApoE reduce la sensibilidad de los macrófagos a ligandos de TLRs y al IFN γ , disminuyendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Por el contrario, ApoE aumenta la secreción de citocinas anti-inflamatorias y promueve la fagocitosis, signos todos ellos característicos de los macrófagos M2 (Martinez *et al.* 2008).

Es importante destacar que la capacidad anti-inflamatoria de ApoE varía en función de la isoforma de esta apolipoproteína. Así, en experimentos de administración de LPS *in vivo*, los animales que expresaban la variante alélica *apoE4* mostraron una respuesta inflamatoria mayor que los portadores del alelo *apoE3*, indicando que la variante *apoE3* es la que desarrolla mayor capacidad inmunorreguladora (Lynch *et al.* 2003). Por otro lado, en una reacción inflamatoria, los macrófagos de ratones Tg en *apoE4* producen niveles de óxido nítrico superiores que los de ratones Tg en *apoE3*, en correlación con un aumento en la captación de arginina dependiente de MAPK (Czapiga and Colton 2003).

A nivel de la inmunidad adaptativa, ApoE es capaz de inhibir la proliferación de células T ($CD4^+$ y $CD8^+$) activadas por mitógenos, efecto en el que está implicada una disminución en la capacidad de producción de IL-2 por los linfocitos T (*Kelly et al. 1994*). ApoE también regula los mecanismos de presentación antigénica, necesarios para la activación de los linfocitos T. Así parece desprenderse del aumento de la actividad de las APCs que se observa en los ratones ApoE^{-/-} (*Tenger and Zhou 2003*). No obstante, aun no está claro si ApoE influye directamente en el procesamiento y presentación antigénica o si este efecto es la consecuencia de dos fenómenos observados en los ratones ApoE^{-/-}, como el desequilibrio hacia el patrón de respuesta Th1 o el incremento en la expresión de moléculas MHC II y co-estimuladoras. Los defensores de un efecto directo extrapolan a las moléculas MHC convencionales resultados que muestran que ApoE facilita la presentación de antígenos lipídicos a las células NKT por moléculas CD1 (*Yoshimoto et al. 1995*). Estas moléculas (CD1^{a-d} en humanos y CD1^d en ratones), similares en estructura a moléculas MHC de clase I pero en función a moléculas MHC de clase II, pueden presentar antígenos lipídicos a células NKT. Dado que las células NKT, tras reconocer complejos CD1-Ag vía TCR, secretan cantidades elevadas de citocinas reguladoras como IL-4 (*Singh et al. 2001*). ApoE potenciaría este efecto inhibitorio de la respuesta inmune, contribuyendo a amortiguar la reacción inflamatoria. Recientemente se ha demostrado que las células B utilizan las vías de presentación de antígenos lipídicos, en las que participa ApoE, más eficientemente que las células dendríticas (*Allan et al. 2009*).

Nuestros ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} desarrollaron una artritis más severa y acelerada que los ratones B10.RIII.WT, siendo esta gravedad muy próxima a la observada en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}, si bien en estos últimos el cuadro clínico fue algo más severo. Esta apreciación clínica se corroboró a nivel radiológico, observándose mayor edema, osteopenia yuxtaarticular, estrechamiento del espacio articular y mayor presencia de erosiones marginales. Estos resultados nos están sugiriendo que el agravamiento de la AIC en los ratones deficientes en ApoE está mucho más en relación con los niveles circulantes de esta apolipoproteína que con las alteraciones del perfil lipídico secundarias a dicha deficiencia. Dado que la mayor parte de la ApoE circulante, que es la que nosotros estamos midiendo, está producida en el hígado, debemos interpretar estos resultados con cautela, ya que no conocemos con exactitud el grado de disminución de ApoE en los macrófagos tisulares, los cuales probablemente están interviniendo más directamente en la patogenia del proceso.

Uno de los hallazgos clínicos que más llamó la atención en nuestro estudio fue la marcada osteopenia de los ratones ApoE^{-/-} con AIC, mucho más marcada que la observada en los ratones WT con artritis. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Lee y colaboradores, quienes realizaron un estudio para evaluar la posible asociación entre el genotipo de ApoE y la pérdida de densidad mineral ósea en una población de mujeres post-menopáusicas con AR. En consonancia con lo anteriormente comentado, estos autores observaron que las mujeres portadoras del alelo *apoE4*, con menor capacidad antiinflamatoria que la variante *apoE3*, se encontraban dentro del grupo con mayor osteoporosis (Lee, Lee and Yoo 2005).

En apoyo de la hipótesis de un papel de los niveles de ApoE en el fenotipo artritogénico de los ratones empleados en nuestro estudio están los resultados de Karussis y colaboradores (2003) en la encefalomiелitis experimental autoinmune, el modelo murino de esclerosis múltiple, provocada por inmunización con péptidos de la mielina. Estos autores obtuvieron resultados similares, mostrando que los ratones deficientes en ApoE desarrollan una EAE más severa que los controles, con un mayor infiltrado de células inflamatorias en el sistema nervioso central (Karussis et al. 2003). Además, cuando trataron a estos ratones con el péptido COG133, anteriormente mencionado, inhibieron la activación de la microglia y de los macrófagos, así como la producción de citocinas pro-inflamatorias en el tejido nervioso, disminuyendo como consecuencia las manifestaciones clínicas y la mortalidad acelerada características de la EAE (Li et al. 2006).

Efecto de la dieta rica en colesterol en el perfil lipídico, los niveles de ApoE y la AIC

Desde hace más de una década se conoce la relación entre la restricción calórica en la dieta y la mejoría clínica en varios modelos animales de enfermedad, fundamentalmente en los modelos murinos de lupus eritematoso (Brown 2000). Así, estudios realizados en ratones MRL/lpr han demostrado que la reducción de un 30-40% en la ingesta de alimentos previene la mortalidad acelerada y el desarrollo del síndrome proliferativo que caracterizan a este modelo. Esta evolución favorable se asocia a la reducción en la secreción de IgG_{2a}, la subclase predominante en los depósitos glomerulares de inmunoglobulinas, característicos de la nefritis lúpica (Leiba et al. 2001, Hong et al. 2009). También se ha demostrado que la reducción del aporte energético a los ratones NZB/NZW atenúa la sobreproducción de IL-2 e IFN γ (Petri 2001) y reduce la progresión de la

glomerulonefritis por inmunocomplejos, mejorando significativamente su supervivencia. En pacientes con lupus eritematoso o con artritis reumatoide, las dietas hiperlipidémicas, ricas en colesterol y grasas saturadas, además de empeorar la esperanza de vida, por su asociación a la producción de accidentes vasculares, se asocian a un incremento en la sintomatología inflamatoria característica de estas enfermedades (*Caetano et al. 2009*).

Con estos antecedentes en mente, nos propusimos comprobar el efecto de una dieta hipercolesterolémica en nuestros ratones con AIC, en presencia de niveles normales, reducidos o ausentes de ApoE. En base a los antecedentes expuestos en los modelos murinos de LES, cabía esperar en principio un empeoramiento del curso clínico en los animales alimentados con dieta HC. Sin embargo, lo que se observó fue una reducción de la severidad de la artritis en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-}. La reducción llegó al punto de que los *scores* clínicos de severidad fueron similares en estos dos grupos, cuando en ausencia de dieta HC la artritis fue significativamente más severa en el grupo ApoE^{+/-}. Por el contrario, la dieta HC no modificó la severidad de la sintomatología de los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} cuyos índices clínicos y radiológicos de inflamación articular fueron similares a los observados en los ratones alimentados con dieta convencional.

Dos trabajos previos habían demostrado que la administración de una dieta aterogénica, rica en colesterol, en ratones C57BL/6 aumenta los niveles de expresión de ApoE en hígado (*Peet et al. 1998*) o en el suero de ratones WT y ApoE^{+/-} (*Zhang et al. 1994*). Este aumento de ApoE apoya nuestra hipótesis a favor de un papel anti-inflamatorio de esta apolipoproteína, aunque en el primero de los trabajos comentados, los niveles de ApoE se estudiaron evaluando la expresión de ARN_m en los hepatocitos. Para confirmar esta variable en nuestro modelo cuantificamos mediante un ensayo de ELISA los niveles de ApoE en el suero de los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.WT, inmunizados con CII-CFA y alimentados con dieta normal o HC. Los resultados mostraron que la dieta HC aumentó significativamente los niveles de ApoE en el suero de los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-} con respecto a los ratones a los que no se les había administrado dieta, siendo más marcado este aumento en el grupo de ratones WT alimentados con dieta HC. Estos resultados no coinciden exactamente con los publicados por Zhang y colaboradores, que muestran unos niveles de ApoE similares tras administración de dieta HC en los ratones ApoE^{+/-} y WT (*Zhang et al. 1994*). El hecho de que

estos autores incluyeran en su dieta aterogénica 0,5% de colato, lo cual favorece la absorción intestinal de colesterol, podría explicar esta pequeña discrepancia.

Además, llevamos a cabo un estudio más completo del perfil lipídico en el suero de los ratones alimentados con dieta HC antes de la inmunización con CII y a las 12 semanas de evolución de la AIC. Estos estudios pusieron en evidencia que la administración de la dieta aumenta los niveles circulantes de colesterol total y LDL/VLDL en los ratones B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-}, tal como había sido descrito por otros autores (*Zhang et al. 1994*). Bobková y colaboradores, en cambio, a pesar de observar un aumento en la colesterolemia tras la administración de una dieta rica en colesterol en todos los grupos, sólo observaron un aumento en la fracción LDL/VLDL en los ratones ApoE^{+/-} y ApoE^{-/-} (*Bobkova et al. 2004*). Cuando valoramos los niveles de HDL en presencia de dieta HC, se puso en evidencia un aumento en el grupo de los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-}. Esto contrasta con lo publicado por Zhang y colaboradores, quienes no observaron ningún cambio en los niveles de esta fracción lipoproteica (*Zhang et al. 1994*). Por el contrario, los niveles de HDL en nuestros ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} disminuyeron tras la administración de dieta HC, lo cual coincide con lo publicado en la literatura (*Zhang et al. 1994*). Finalmente, sólo observamos aumento en los niveles séricos de triglicéridos en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} alimentados con dieta HC, mientras que en los otros dos grupos no se encontró una diferencia significativa con respecto a los animales alimentados con dieta convencional. Estos resultados difieren de los presentados por Zhang y colaboradores, quienes describen una reducción del 40% en los niveles de triglicéridos de los ratones deficientes en ApoE respecto a los WT (*Zhang et al. 1994*). De nuevo, atribuimos estas diferencias al empleo de dietas diferentes, con distinta composición calórica y presencia de colato en el caso del trabajo de estos últimos autores.

Relación de la severidad de la artritis en ratones deficientes en ApoE con modificaciones en los indicadores de la inmunidad innata y adaptativa.

En el presente trabajo hemos estudiado los niveles de expresión de diferentes citocinas pro-inflamatorias y artritogénicas en las articulaciones de los ratones inmunizados con CII mediante análisis de los niveles de ARN_m. Nuestros resultados muestran un marcado aumento en los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-21, IFN γ y TNF α en los animales con artritis. En todas estas citocinas, con la excepción de TNF α , este aumento fue más marcado en los ratones deficientes en ApoE con respecto a los controles. Dado el

papel que se le ha atribuido al TNF α en la inflamación y la destrucción articular de los pacientes con AR, fue una sorpresa encontrar niveles de ARN_m para TNF α muy similares entre ambos grupos de animales con una evolución clínica diferente. No obstante, dada la relevancia del TNF α en la respuesta fisiológica a la inflamación y en la respuesta inmune adaptativa, es lógico concebir que su expresión y actividad estén estrictamente controlados a múltiples niveles, dadas las consecuencias patológicas que conlleva su producción en exceso (*Schottelius et al. 2004*). Podríamos especular, por lo tanto, que la regulación post-transcripcional de TNF α en los ratones ApoE^{-/-} inmunizados podría ser deficiente, sin verse afectados los niveles de expresión de esta citocina a nivel del ARN_m. No obstante, esta es una hipótesis que no hemos podido constatar al no disponer de una técnica capaz de cuantificar la concentración de esta proteína en los tejidos. Por otro lado, en nuestra experiencia, la correlación de los niveles séricos, tanto de TNF α como de otras citocinas, con la producción de las mismas a nivel tisular es baja y los resultados obtenidos son generalmente de difícil interpretación.

Un hallazgo curioso es el reportado por Notley y colaboradores, quienes demostraron que cuando se bloqueaba TNF α , con una proteína de fusión TNFR-Fc o con un anticuerpo monoclonal anti-TNF, se reducía la severidad de la AIC pero, inesperadamente, se expandían las supoblaciones Th1 y Th17 (cuya patogenicidad habían puesto en evidencia por transferencia adoptiva). En base a sus resultados, estos investigadores postularon que TNF α cumple dos funciones diferentes en la AIC: por un lado promueve la acumulación de células Th1 y Th17 en las articulaciones afectadas por la artritis y, por otra parte, limita las respuestas de las células T CD4⁺ patogénicas en los órganos linfoides periféricos (*Notley et al. 2008*).

Se cuantificaron también los niveles de ARN_m de las citocinas artritogénicas IL-1 β , IL-6 y TNF α en las articulaciones de los ratones alimentados con dieta HC tras la inducción de AIC. Los ratones heterocigotos para ApoE mostraron un patrón de expresión de citocinas similar al de los ratones deficientes en ApoE. Sin embargo, una vez más los niveles de TNF α se mantuvieron sin cambios entre los tres grupos de estudio. Un dato curioso es que la dieta HC parece no modular el patrón de expresión de las citocinas pro-inflamatorias estudiadas, a pesar de la mejoría clínica. No obstante, tal como lo sugerimos para la citocina TNF α , es probable que la dieta HC esté regulando la expresión de las citocinas pro-inflamatorias a nivel post-transcripcional.

En la AIC, el daño estructural de las articulaciones está provocado por un efecto directo de las células inflamatorias, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Sin embargo, la inmunidad humoral, fundamentalmente en forma de anticuerpos IgG₁ e IgG_{2a} anti-CII, también participa en la patogenia del proceso, si bien su papel parece menos decisivo. Independientemente de su contribución en la artritis, el estudio del balance de los títulos de anticuerpos anti-CII de estas dos subclases de IgGs ofrece una visión indirecta de la participación de los linfocitos Th1 (IgG_{2a}) o Th2 (IgG₁) en el proceso. En paralelo con un aumento en la severidad de la AIC, en los ratones deficientes en ApoE observamos una respuesta alterada de anticuerpos anti-CII (CII) tras la inmunización con este antígeno. Concretamente, los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} produjeron niveles más bajos de anticuerpos IgG₁ anti-CII que los ratones B10.RIII.WT, indicando una inhibición de la diferenciación al fenotipo Th2, menos inflamatorio. Los experimentos realizados en presencia de una dieta HC ofrecieron resultados complementarios de interés, como la disminución significativa en los niveles de IgG_{2a} en el grupo de los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-}, pero no en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} que siguieron mostrando niveles elevados. Por el contrario, la dieta HC no modificó significativamente los niveles de IgG₁ en ninguno de los tres grupos. Estos resultados indicarían una depresión en la respuesta de las células Th1 como consecuencia de la administración de una dieta HC, la cual incrementa los niveles de ApoE en los ratones WT y ApoE^{+/-}. Por el contrario, esto no ocurre en los animales que no tienen la capacidad de compensar el exceso de colesterol en la dieta con un incremento en los niveles séricos de ApoE.

El porcentaje de las diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺ se evaluó también en los ganglios linfáticos regionales analizando los porcentajes de células que sintetizan las citocinas específicas de cada uno de estos subtipos celulares. Tanto en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} como en los B10.RIII.WT el porcentaje de células Th1, definidas por el fenotipo CD4⁺IFNγ⁺, y Th17 (CD4⁺IL-17⁺), estaba aumentado, aunque el incremento de ambas subpoblaciones fue más marcado en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}. Por el contrario, la frecuencia de células T CD4⁺ con actividad reguladora/supresora (células Treg, caracterizadas por un fenotipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), no se vio afectada por la deficiencia de ApoE.

El protagonismo de las células Th17 en la patogenia de la AR y en su modelo experimental de la AIC está claramente definido (*Lubberts et al. 2004, Sato et al. 2006*). En el

tiempo en el que imperaba el paradigma Th1/Th2 en Inmunología, el papel en la AIC y la AR de las citocinas IL-2 y TNF α , típicamente asociadas a la respuesta Th1, junto al papel protector de la IL-4, citocina característica de Th2, ubicaba a la AIC como un modelo de enfermedad Th1. Sin embargo, el papel protector de IFN γ , citocina clave en el fenotipo Th1, en la AIC descomponía este esquema (*Vermeire et al. 1997*). La observación de que un anticuerpo anti-IL-12, citocina estimuladora de la secreción de IFN γ y de la diferenciación a Th1, previniera completamente el desarrollo de AIC (*Matthys et al. 1998*) añadió aún más confusión. Más aún, cuando el efecto fue más marcado en ratones deficientes en el receptor de IFN γ . Diez años más tarde pudimos entender estos resultados. El anticuerpo anti-IL-12 empleado por Matthys y colaboradores en sus experimentos reconoce una de las dos subunidades que componen la IL-12, denominada p40. Pero esta subunidad es compartida por otra citocina, la IL-23, requerida para un nuevo subtipo funcional de linfocitos T CD4⁺, las células Th17. Así, el tratamiento con el anticuerpo de Matthys bloquea también el desarrollo de las células Th17, las cuales juegan un papel central en el patogenia de la AIC. Prueba de ello es que su neutralización mediante tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17 previene el desarrollo de artritis y reduce notablemente las respuestas humoral y celular en la AIC (*Kelchtermans et al. 2009*).

Los linfocitos Th17 incitan a otras células a producir IL-1 β , TNF α , IL-6, RANK-L, metaloproteinasas y quimiocinas, provocando una potente respuesta inflamatoria local y sistémica (*Crome, Wang and Levings 2010, Luckheeram et al. 2012*). Otra de las citocinas efectoras de las células Th17 es la IL-22, una citocina de la familia de la IL-10, que actúa sobre varios tipos celulares (hepatocitos, células epiteliales, queratinocitos y fibroblastos) induciendo metaloproteinasas y quimiocinas. La IL-22 también participa en la patogenia de la AIC, como demuestra la reducción en la susceptibilidad a AIC en ratones deficientes en IL-22 (*Geboes et al. 2009*). Sin embargo, estos ratones deficientes en IL-22 tienen niveles más altos de anticuerpos anti-CII, sugiriendo que la respuesta autoinmune antígeno-específica juega un papel más secundario que la inmunidad innata en la patogenia de la AIC. En línea con esto, en la patogenia de la AIC se ha implicado a citocinas típicas de la respuesta inmune innata, como IL-1, IL-18 e IL-33 (*Banda et al. 2003, Palmer et al. 2009*).

El papel de las células Th1 en la AIC y en la AR, en cambio, es aún controvertido. La administración de IFN γ al mismo tiempo que se lleva a cabo la inmunización con CII aumentó la incidencia de AIC y aceleró el inicio de la enfermedad en los experimentos

desarrollados por Cooper y colaboradores (Cooper, Sriram and Ranges 1988). Además, la deficiencia en IFN γ aumentó la susceptibilidad de los ratones C57BL/6 a la AIC (Guedez et al. 2001, Chu et al. 2003). Por el contrario, otros trabajos sugieren una función protectora de IFN γ en la AIC. Se ha demostrado, por ejemplo, que los ratones DBA/1 deficientes en el receptor de IFN γ desarrollan una AIC más severa y acelerada que los ratones control (Manoury-Schwartz et al. 1997, Vermeire et al. 1997). Volviendo a los experimentos de Matthys y colaboradores, comentados anteriormente, en los que empleaban un anticuerpo frente a la subunidad p40 de la IL-12 y la IL-23 (Matthys et al. 1998), el hecho de que este anticuerpo fuera aún más eficaz previniendo la artritis en los ratones deficientes en el receptor de IFN γ , indica que esta citocina, y en consecuencia las células Th1, también participan en los mecanismos patogénicos responsables del desarrollo de AIC, si bien su papel en el proceso parece menos relevante que el de las células Th17.

También a nivel clínico, diversos estudios han demostrado que en el tejido sinovial inflamado de los pacientes con artritis reumatoide se ponen en marcha mecanismos moduladores que polarizan la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia el fenotipo Th17 y que estos fenómenos guardan una estrecha correlación con la producción de erosiones en el cartílago y el hueso adyacente en las articulaciones de estos pacientes (Dong and Zhu 2012). En la base de esta asociación están las evidencias que demuestran que las células Th17 inducen la expresión en las células sinoviales de RANK-L, un ligando implicado en la activación de NF κ B. La unión de RANK-L a RANK, expresado en los osteoclastos, activa a estas células de estirpe macrofágica y estimula su diferenciación a células con una intensa capacidad para reabsorber tejido óseo, con la consecuente producción de las erosiones yuxtaarticulares características de la AR y de la AIC (Okamoto and Takayanagi 2011). En línea con ello, estudios clínicos preliminares han mostrado que la neutralización de la citocina IL-17 interfiere en la cascada inflamatoria intraarticular en los pacientes con AR en fase activa, mejorando el curso clínico de la artritis (van den Berg and Miossec 2009).

Recapitulación y perspectiva

Los datos aportados en el presente trabajo apoyan la idea de que ApoE tiene la capacidad de modular negativamente la actividad inflamatoria en la AIC. Este efecto parece llevarse a cabo a través de una modulación tanto de la respuesta inmune innata, como demuestra la disminución en la expresión de la mayoría de las citocinas pro-

inflamatorias, como de la respuesta inmune adaptativa, según indican los cambios en los perfiles de expresión en las articulaciones de citocinas características de las poblaciones Th1 y Th17 y en los isotipos de IgG en las respuestas humorales anti-CII.

Aunque aún estamos lejos de establecer las bases moleculares del efecto inmunorregulador de ApoE, se postula que interviene en diversas vías de señalización. Por un lado, ApoE podría modular vías de transcripción sensibles a modificaciones redox, como las que implican a NFκB y a MAPK (*Ophir et al. 2005*). ApoE podría regular también la respuesta inmune mediante unión a sus receptores de superficie (*Jofre-Monseny, Minihane and Rimbach 2008*). Recientemente ha cobrado auge la posibilidad de que ApoE interactúe con otras moléculas inmunorreguladoras, como TGFβ1, en el contexto del agregado molecular que forma las lipoproteínas (*Tesseur et al. 2009*).

TGFβ (*transforming growth factor-β*) constituye una familia de factores solubles con múltiples funciones en desarrollo, mantenimiento y reparación de tejidos y en el control de la respuesta inmune, donde el miembro más relevante es TGFβ1 (*Derynck and Zhang 2003*). Tesseur y colaboradores han descrito recientemente que TGFβ1 contiene varias hélices anfipáticas y dominios hidrofóbicos similares a ApoE (*Tesseur et al. 2009*). De hecho, TGFβ1 se asocia con lipoproteínas aisladas de plasma humano y de células en cultivo (hepatocitos o astrocitos) y su bioactividad es mayor en preparaciones enriquecidas en HDLs. La asociación de TGFβ con ApoE podría regular su señalización a diferentes niveles: (1) facilitando su difusión; (2) regulando la intensidad de señalización; y (3) contribuyendo a la especificidad por receptores celulares. Sin embargo, no es sencillo reproducir *in vitro* el modelo molecular de la asociación ApoE/TGFβ1 con proteínas purificadas, dado que ambas moléculas no se unen directamente entre sí, sino a través de los lípidos que componen el entramado de la lipoproteína (*Tesseur et al. 2009*).

Para complicar un poco más este modelo un tercer factor, el colesterol, entra también en escena. Por un lado, sus niveles están estrechamente regulados por ApoE, mediante transporte retrógrado al hígado. Por otro, el colesterol es crítico para la formación de dos dominios de membrana: las balsas lipídicas y las caveolas (*Harder and Simons 1997*). Esto es importante, ya que la localización de las dos subunidades del receptor de TGFβ1 (TβR-I y TβR-II) en estos dominios provoca su endocitosis y posterior degradación, regulando negativamente la señalización de TGFβ a través de Smads (*Di Guglielmo et al. 2003*). Por el contrario, la presencia de las subunidades del receptor fuera de

estos dominios conlleva una endocitosis mediada por clatrina, generándose endosomas con capacidad señalizadora y activación de la ruta de señalización de TGF β dependiente de Smads (Di Guglielmo et al. 2003). Resultados recientes de Chen y colaboradores muestran que los niveles elevados de colesterol en plasma, o la adición de colesterol a células en cultivo, interfieren con la unión de TGF β 1 a sus receptores en la membrana celular. Por el contrario, el tratamiento con estatinas, que disminuyen o eliminan el colesterol, incrementa el coeficiente de unión de TGF β 1 a sus receptores en todos los tipos celulares estudiados (Chen, Huang and Huang 2008). Dado el papel central de TGF β 1 en el control y diferenciación de la respuesta inmune parece importante desentrañar las consecuencias de esta triple asociación para poder comprender el efecto inmunorregulador de ApoE.

TGF β 1 es un factor clave para la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ naïve (CD25⁻ Foxp3⁻) a dos fenotipos funcionalmente opuestos: los **iTreg** -linfocitos T reguladores inducibles, CD25⁺ Foxp3⁺, con actividad supresora de la respuesta inmune-, y las células **Th17** -linfocitos T efectores, CD25⁺ Foxp3⁻, productores de IL-17, entre otras citocinas, que promueven una potente respuesta inmunológica frente a bacterias extracelulares y hongos y poseen un elevado potencial inflamatorio- (Bettelli et al. 2006, Mucida et al. 2007, Manel, Unutmaz and Littman 2008, Yang et al. 2008). Lo que hace peculiar esta ambivalencia de TGF β es que en muchas enfermedades autoinmunes, como la AR o la esclerosis múltiple, la activación de células Th17 frente a autoantígenos coincide con una disfunción de linfocitos Treg (Awasthi, Murugaiyan and Kuchroo 2008). Diferentes estudios han ayudado a explicar esta aparente ambivalencia de TGF β en el control de la diferenciación funcional de linfocitos T CD4⁺: TGF β promueve la generación de linfocitos Th17 si concurren citocinas pro-inflamatorias (principalmente IL-6 e IL-21, aunque también IL-1 β , regulando conjuntamente la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y ROR α (Bettelli et al. 2006, Mucida et al. 2007, Manel et al. 2008, Yang et al. 2008). Sin embargo, en ausencia de estas citocinas, TGF β induce expresión del factor de transcripción Foxp3 promoviendo la generación de linfocitos iTreg. Además de este mecanismo, en nuestro grupo hemos observado recientemente que la regulación de la intensidad de la señalización por TGF β en la célula T naïve determina en gran medida su diferenciación funcional, independientemente de la presencia o ausencia de señales pro-inflamatorias en el entorno (Postigo et al., manuscrito en preparación). En este sentido, reguladores positivos de la señalización por TGF β promueven el desarrollo preferencial de linfocitos Treg incluso en presencia de IL-6 (Iglesias et al. 2013). Un concepto que emerge con fuerza en los últimos

años es que las poblaciones Th son plásticas y que por lo tanto los fenotipos funcionales no son estables (*Littman and Rudensky 2010*). Esto es especialmente relevante en el caso de los linfocitos Tregs que pueden convertirse en células productoras de IL-17 en presencia de estímulos pro-inflamatorios, tales como IL-6 e IL-1 β (*Xu et al. 2007, Li, Kim and Boussiotis 2010*).

Limitaciones del modelo AIC para estudiar la relación aterosclerosis-inflamación sistémica

Una de las premisas del presente trabajo fue la especial susceptibilidad de los pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas al desarrollo de una enfermedad aterosclerótica acelerada, causa principal de morbi-mortalidad en estas entidades clínicas. Esta circunstancia convierte a los modelos experimentales de estas enfermedades en herramientas especialmente atractivas para estudiar mecanismos patogénicos y diseñar estrategias terapéuticas encaminadas a prevenir la aterosclerosis en estos pacientes. Aunque, por las razones que se exponen a continuación, el presente trabajo no ha tenido finalmente esta orientación, queremos terminar la discusión con un breve comentario sobre las limitaciones de muchos modelos murinos de enfermedades autoinmunes, y en concreto el modelo AIC, para ayudar a buscar soluciones al problema expuesto.

La primera cuestión a tener en cuenta es la particular resistencia del ratón al desarrollo de aterosclerosis por su peculiar perfil lipídico, con niveles de HDL más elevados que en otras especies como la humana. Sólo los ratones deficientes en moléculas relevantes para la regulación del metabolismo lipídico, como ApoE o su receptor LDLR, son susceptibles a padecer lesiones ateroscleróticas similares a las desarrolladas en los seres humanos. La segunda es que la mayoría de los modelos de enfermedades inflamatorias en el ratón se desencadenan mediante protocolos de inmunización cuya eficiencia es absolutamente dependiente del empleo de adyuvantes potentes. En el caso de la AIC se utiliza el adyuvante completo de Freund (CFA), suplementado con una alta concentración de *Mycobacterium tuberculosis* muerto.

El problema consiste en que tanto el CFA, como el adyuvante incompleto (IFA, desprovisto de *Mycobacterium*) o incluso las sales de aluminio (*alum*: adyuvante habitual en vacunación en humanos) inhiben el desarrollo de aterosclerosis tanto en los ratones ApoE^{-/-} (*Hansen et al. 2001, Mallat et al. 2003, Khallou-Laschet et al. 2006, Klingenberg et al. 2012*) como en los LDLR^{-/-} (*Binder et al. 2003*). Este efecto inhibitorio se obtiene tanto tras la administración aislada de los adyuvantes, como al emplearse en protocolos de

inmunización con diversos antígenos y, además, es independiente de su ruta de administración (*Khallou-Laschet et al. 2006*). En las fases iniciales de este proyecto, también nosotros constatamos este efecto protector de la aterosclerosis tanto en los ratones ApoE^{-/-} inmunizados con CII-CFA como en aquellos a los que les habíamos administrado PBS emulsionado con CFA, los cuales evidentemente no desarrollaban AIC. Los mecanismos con los que se ha asociado este efecto inhibitor del desarrollo de la placa ateromatosa, por coincidir tras el uso de los tres adyuvantes son: (1) el incremento en la estimulación de respuestas Th2; (2) la producción de anticuerpos de tipo IgM contra LDL oxidadas; y (3) el cambio del perfil lipídico a un fenotipo ateroprotector (*Khallou-Laschet et al. 2006*).

Por el contrario, la administración de ADN bacteriano rico en dinucleótidos CpG no metilados, un nuevo adyuvante cuyo mecanismo de acción está mediado por su interacción con receptores TLR-9 en macrófagos y células dendríticas (*Weiner 2000, Gupta and Agrawal 2010*), no afecta al desarrollo de la placa de ateroma en los ratones deficientes en ApoE (*Khallou-Laschet et al. 2006*). La puesta a punto del modelo de AIC utilizando como adyuvante CpG en lugar de CFA podría eventualmente posibilitar el análisis del efecto de la artritis inducida por CII sobre la aterosclerosis que se desarrolla en los ratones deficientes en ApoE o en LDLR. Así mismo, Rose y colaboradores han generado recientemente un modelo murino que desarrolla espontáneamente una patología de características muy similares a la AR en humanos (los ratones K/BxA^{B7}), y que es también susceptible a desarrollar aterosclerosis, y todo ello sin necesidad de utilizar adyuvantes (*Rose et al. 2012*). Este nuevo modelo murino también podría ser una alternativa para estudiar la relación entre arteriosclerosis y AR/AIC.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1) Los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} inmunizados con CII-CFA desarrollan una AIC más severa y acelerada que los ratones B10.RIII.WT, tanto a nivel clínico, radiológico e histológico. Además, estos ratones deficientes en ApoE presentan mayores niveles de colesterol total y triglicéridos con respecto a los ratones B10.RIII.WT. Estos mayores niveles de colesterol se deben principalmente a un aumento en la fracción LDL/VLDL. La inducción de artritis en ambos grupos de ratones no modificó su perfil lipídico.
- 2) El aumento en la severidad de la artritis en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} con respecto a los B10.RIII.WT se asocia con un aumento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias en las articulaciones, una expansión de las subpoblaciones celulares Th1 y Th17 y menores niveles de anticuerpos anti-CII del subtipo IgG₁.
- 3) El desarrollo de AIC en nuestro modelo no empeora la enfermedad aterosclerótica en los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-} respecto a los ratones a los que no se les indujo la enfermedad. El adyuvante utilizado en la inmunización tendría un efecto ateroprotector que enmascararía el efecto pro-aterogénico del ambiente inflamatorio presente en la AR. Un modelo experimental que requiera este tipo de adyuvante para inducir artritis no es el adecuado para estudiar la relación entre ambas patologías.
- 4) Los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} presentan un perfil lipídico similar al de los ratones control, a pesar de tener la mitad de ApoE en circulación con respecto a los B10.RIII.WT. Sólo tienen niveles ligeramente menores de la fracción HDL con respecto a los ratones B10.RIII.WT. Estos ratones heterocigotos para ApoE desarrollan una AIC de mayor severidad que los ratones B10.RIII.WT, similar a la observada en los ratones deficientes para ApoE, tanto a nivel clínico como radiológico.
- 5) No se observan diferencias entre las propiedades pro o anti-inflamatorias de las partículas de HDL de los ratones B10.RIII.ApoE^{+/-} y B10.RIII.ApoE^{-/-} respecto a los ratones B10.RIII.WT, lo cual sugiere que no es el papel de ApoE el metabolismo de lípidos lo que produce el agravamiento de la artritis en los ratones heterocigotos y deficientes en ApoE.
- 6) La administración de una dieta hipercolesterolémica sólo produce un ligero aumento en la colesterolemia en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-}, afectando severamente a los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}. Por otra parte, la administración de este tipo de dieta disminuye la severidad de la artritis en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-},

sin afectar a los ratones B10.RIII.ApoE^{-/-}. El efecto beneficioso de la dieta hipercolesterolémica en la AIC de los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-} se correlaciona con un aumento en los niveles circulantes de ApoE.

7) La administración de una dieta hipercolesterolémica modifica el patrón de respuesta de anticuerpos anti-CII en los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-} inmunizados con CII. Así, los ratones B10.RIII.WT y B10.RIII.ApoE^{+/-} a los que se les indujo artritis muestran menores niveles de anticuerpos anti-CII del subtipo IgG_{2a} tras la administración de una dieta rica en colesterol. La dieta aterogénica, en cambio, no modula la expresión de citocinas pro-inflamatorias en las articulaciones de los ratones luego de la inducción de artritis.

8) Por lo tanto, ApoE actúa como una molécula inmunomoduladora en el proceso inflamatorio que se desarrolla en la artritis inducida por colágeno.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon-Riquelme, M. E. (2007) Recent advances in the genetics of autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1110, 1-9.
- Ali, K., M. Middleton, E. Pure & D. J. Rader (2005) Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res*, 97, 922-7.
- Allan, C. M., S. Taylor & J. M. Taylor (1997) Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J Biol Chem*, 272, 29113-9.
- Allan, L. L., K. Hoefl, D. J. Zheng, B. K. Chung, F. K. Kozak, R. Tan & P. van den Elzen (2009) Apolipoprotein-mediated lipid antigen presentation in B cells provides a pathway for innate help by NKT cells. *Blood*, 114, 2411-6.
- Ansell, B. J., K. E. Watson, A. M. Fogelman, M. Navab & G. C. Fonarow (2005) High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol*, 46, 1792-8.
- Apostolou, I. & H. von Boehmer (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*, 199, 1401-8.
- Aranami, T. & T. Yamamura (2008) Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int*, 57, 115-20.
- Asquith, D. L., A. M. Miller, A. J. Hueber, F. Y. Liew, N. Sattar & I. B. McInnes (2010) Apolipoprotein E-deficient mice are resistant to the development of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 62, 472-7.
- Awasthi, A., G. Murugaiyan & V. K. Kuchroo (2008) Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *J Clin Immunol*, 28, 660-70.
- Baitsch, D., H. H. Bock, T. Engel, R. Telgmann, C. Muller-Tidow, G. Varga, M. Bot, J. Herz, H. Robenek, A. von Eckardstein & J. R. Nofer (2011) Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1160-8.
- Bancroft, M. & R. Bellairs (1977) Placodes of the chick embryo studied by SEM. *Anat Embryol (Berl)*, 151, 97-108.
- Banda, N. K., A. Vondracek, D. Kraus, C. A. Dinarello, S. H. Kim, A. Bendele, G. Senaldi & W. P. Arend (2003) Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. *J Immunol*, 170, 2100-5.
- Bartoloni, E., A. Alunno, O. Bistoni & R. Gerli (2010) How early is the atherosclerotic risk in rheumatoid arthritis? *Autoimmun Rev*, 9, 701-7.
- Begovich, A. B., V. E. Carlton, L. A. Honigberg, S. J. Schrodi, A. P. Chokkalingam, H. C. Alexander, K. G. Ardlie, Q. Huang, A. M. Smith, J. M. Spoerke, M. T. Conn, M. Chang, S. Y. Chang, R. K. Saiki, J. J. Catanese, D. U. Leong, V. E. Garcia, L. B. McAllister, D. A. Jeffery, A. T. Lee, F. Batliwalla, E. Remmers, L. A. Criswell, M. F. Seldin, D. L. Kastner, C. I. Amos, J. J. Sninsky & P. K. Gregersen (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 75, 330-7.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner & V. K. Kuchroo (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441, 235-8.
- Binder, C. J., S. Horkko, A. Dewan, M. K. Chang, E. P. Kieu, C. S. Goodyear, P. X. Shaw, W. Palinski, J. L. Witztum & G. J. Silverman (2003) Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med*, 9, 736-43.
- Bobkova, D., E. Honsova, J. Kovar & R. Poledne (2004) Effect of diets on lipoprotein concentrations in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Physiol Res*, 53, 635-43.

- Boissier, M. C., L. Semerano, S. Challal, N. Saidenberg-Kermanac'h & G. Falgarone (2012) Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun.*
- Brand, D. D., A. H. Kang & E. F. Rosloniec (2003) Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol*, 25, 3-18.
- Brown, A. C. (2000) Lupus erythematosus and nutrition: a review of the literature. *J Ren Nutr*, 10, 170-83.
- Caetano, M. C., T. T. Ortiz, M. T. Terreri, R. O. Sarni, S. G. Silva, F. I. Souza & M. O. Hilario (2009) Inadequate dietary intake of children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Pediatr (Rio J)*, 85, 509-15.
- Carmona, L., M. Cross, B. Williams, M. Lassere & L. March (2010) Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 24, 733-45.
- Cockerill, G. W., K. A. Rye, J. R. Gamble, M. A. Vadas & P. J. Barter (1995) High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 1987-94.
- Cooper, S. M., S. Sriram & G. E. Ranges (1988) Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma. *J Immunol*, 141, 1958-62.
- Coto-Segura, P., E. Coto, V. Alvarez, B. Morales, J. Soto-Sanchez, A. I. Corao & J. Santos-Juanes (2010) Apolipoprotein epsilon4 allele is associated with psoriasis severity. *Arch Dermatol Res*, 302, 145-9.
- Crome, S. Q., A. Y. Wang & M. K. Levings (2010) Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*, 159, 109-19.
- Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein & J. D. Sedgwick (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-8.
- Curotto de Lafaille, M. A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee & J. J. Lafaille (2008) Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*, 29, 114-26.
- Curtiss, L. K. & T. S. Edgington (1978) Identification of a lymphocyte surface receptor for low density lipoprotein inhibitor, an immunoregulatory species of normal human serum low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 61, 1298-308.
- Cvetkovic, J. T., S. Wallberg-Jonsson, E. Ahmed, S. Rantapaa-Dahlqvist & A. K. Lefvert (2002) Increased levels of autoantibodies against copper-oxidized low density lipoprotein, malondialdehyde-modified low density lipoprotein and cardiolipin in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 988-95.
- Czapiga, M. & C. A. Colton (2003) Microglial function in human APOE3 and APOE4 transgenic mice: altered arginine transport. *J Neuroimmunol*, 134, 44-51.
- Charles-Schoeman, C., M. L. Banquerigo, S. Hama, M. Navab, G. S. Park, B. J. Van Lenten, A. C. Wagner, A. M. Fogelman & E. Brahn (2008) Treatment with an apolipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with pravastatin inhibits collagen-induced arthritis. *Clin Immunol*, 127, 234-44.
- Charlton-Menys, V. & P. N. Durrington (2007) Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol*, 93, 27-42.
- Chen, C. L., S. S. Huang & J. S. Huang (2008) Cholesterol modulates cellular TGF-beta responsiveness by altering TGF-beta binding to TGF-beta receptors. *J Cell Physiol*, 215, 223-33.
- Cho, J. H. & P. K. Gregersen (2011) Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med*, 365, 1612-23.
- Cho, Y. G., M. L. Cho, S. Y. Min & H. Y. Kim (2007) Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 7, 65-70.

- Chu, C. Q., Z. Song, L. Mayton, B. Wu & P. H. Wooley (2003) IFN γ deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis*, 62, 983-90.
- Dai, L., D. J. Lamb, D. S. Leake, M. L. Kus, H. W. Jones, C. J. Morris & P. G. Winyard (2000) Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Free Radic Res*, 32, 479-86.
- De Geest, B., D. Stengel, M. Landeloos, M. Lox, L. Le Gat, D. Collen, P. Holvoet & E. Ninio (2000) Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, E68-75.
- Derynck, R. & Y. E. Zhang (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425, 577-84.
- Dessein, P. H., A. E. Stanwix & B. I. Joffe (2002) Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis versus osteoarthritis: acute phase response related decreased insulin sensitivity and high-density lipoprotein cholesterol as well as clustering of metabolic syndrome features in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4, R5.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, A. F. Goodfellow & J. L. Wrana (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*, 5, 410-21.
- Dong, W. & P. Zhu (2012) Functional niche of inflamed synovium for Th17-cell expansion and activation in rheumatoid arthritis: implication to clinical therapeutics. *Autoimmun Rev*, 11, 844-51.
- Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung & E. Latz (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464, 1357-61.
- Durie, F. H., R. A. Fava & R. J. Noelle (1994) Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*, 73, 11-8.
- Durrington, P. N., B. Mackness & M. I. Mackness (2001) Paraonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 473-80.
- Esteban, V., N. Mendez-Barbero, L. J. Jimenez-Borreguero, M. Roque, L. Novensa, A. B. Garcia-Redondo, M. Salas, L. Vila, M. L. Arbones, M. R. Campanero & J. M. Redondo (2011) Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J Exp Med*, 208, 2125-39.
- Fazekas, F., S. Strasser-Fuchs, H. Kollegger, T. Berger, W. Kristoferitsch, H. Schmidt, C. Enzinger, M. Schiefermeier, C. Schwarz, B. Kornek, M. Reindl, K. Huber, R. Grass, G. Wimmer, K. Vass, K. H. Pfeiffer, H. P. Hartung & R. Schmidt (2001) Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology*, 57, 853-7.
- Fazio, S., V. R. Babaev, A. B. Murray, A. H. Hasty, K. J. Carter, L. A. Gleaves, J. B. Atkinson & M. F. Linton (1997) Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4647-52.
- Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton & C. G. Fathman (1996) Mice with a disrupted IFN- γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*, 156, 5-7.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, M. F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M. L. Ballestar, D. Heine-Suner, J. C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez, M. Boix-Chornet, A. Sanchez-Aguilera, C. Ling, E. Carlsson, P. Poulsen, A. Vaag, Z. Stephan, T. D. Spector, Y. Z. Wu, C. Plass & M. Esteller (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10604-9.
- Frostegard, J. (2005) Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1776-85.
- Full, L. E., C. Ruisanchez & C. Monaco (2009) The inextricable link between atherosclerosis and prototypical inflammatory diseases rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 11, 217.

- Gafencu, A. V., M. R. Robciuc, E. Fuior, V. I. Zannis, D. Kardassis & M. Simionescu (2007) Inflammatory signaling pathways regulating ApoE gene expression in macrophages. *J Biol Chem*, 282, 21776-85.
- Gaidukov, L., R. I. Viji, S. Yacobson, M. Rosenblat, M. Aviram & D. S. Tawfik (2010) ApoE induces serum paraoxonase PON1 activity and stability similar to ApoA-I. *Biochemistry*, 49, 532-8.
- Geboes, L., L. Dumoutier, H. Kelchtermans, E. Schurgers, T. Mitera, J. C. Renauld & P. Matthys (2009) Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum*, 60, 390-5.
- Getz, G. S. & C. A. Reardon (2009) Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S156-61.
- Go, G. W. & A. Mani (2012) Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med*, 85, 19-28.
- Gomez-Guerrero, C., B. Mallavia & J. Egido (2011) Targeting Inflammation in Cardiovascular Diseases. Still a Neglected field? *Cardiovasc Ther*.
- Gonzalez-Gay, M. A., C. Gonzalez-Juanatey & J. Martin (2005) Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum*, 35, 8-17.
- Gonzalez-Juanatey, C., J. Llorca & M. A. Gonzalez-Gay (2011) Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease. *Arthritis Res Ther*, 13, R101.
- Goodnow, C. C. (2007) Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell*, 130, 25-35.
- Gotsman, I., A. H. Sharpe & A. H. Lichtman (2008) T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis. *Circ Res*, 103, 1220-31.
- Graham, A., D. G. Hassall, S. Rafique & J. S. Owen (1997) Evidence for a paraoxonase-independent inhibition of low-density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 135, 193-204.
- Gran, B., G. X. Zhang, S. Yu, J. Li, X. H. Chen, E. S. Ventura, M. Kamoun & A. Rostami (2002) IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol*, 169, 7104-10.
- Greenow, K., N. J. Pearce & D. P. Ramji (2005) The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*, 83, 329-42.
- Gregersen, P. K., J. Silver & R. J. Winchester (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30, 1205-13.
- Guedez, Y. B., K. B. Whittington, J. L. Clayton, L. A. Joosten, F. A. van de Loo, W. B. van den Berg & E. F. Rosloniec (2001) Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum*, 44, 2413-24.
- Gupta, G. K. & D. K. Agrawal (2010) CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic application in allergy and asthma. *BioDrugs*, 24, 225-35.
- Hansen, P. R., M. Chew, J. Zhou, A. Daugherty, N. Heegaard, P. Jensen, S. Mouritsen & E. Falk (2001) Freund's adjuvant alone is antiatherogenic in apoE-deficient mice and specific immunization against TNFalpha confers no additional benefit. *Atherosclerosis*, 158, 87-94.
- Harder, T. & K. Simons (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 534-42.
- Harley, J. B. & J. A. James (2006) Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 64, 45-50.

- Harpaz, I., S. Abutbul, A. Nemirovsky, R. Gal, H. Cohen & A. Monsonego (2012) Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL6 mice: Glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol*.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy & C. T. Weaver (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6, 1123-32.
- Hasty, A. H., M. F. Linton, L. L. Swift & S. Fazio (1999) Determination of the lower threshold of apolipoprotein E resulting in remnant lipoprotein clearance. *J Lipid Res*, 40, 1529-38.
- Hewagama, A. & B. Richardson (2009) The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 33, 3-11.
- Hirsch-Reinshagen, V., J. Donkin, S. Stukas, J. Chan, A. Wilkinson, J. Fan, J. S. Parks, J. A. Kuivenhoven, D. Lutjohann, H. Pritchard & C. L. Wellington (2009) LCAT synthesized by primary astrocytes esterifies cholesterol on glia-derived lipoproteins. *J Lipid Res*, 50, 885-93.
- Holmdahl, R., M. E. Andersson, T. J. Goldschmidt, L. Jansson, M. Karlsson, V. Malmstrom & J. Mo (1989) Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *APMIS*, 97, 575-84.
- Hong, Y. H., C. J. Huang, S. C. Wang & B. F. Lin (2009) The ethyl acetate extract of alfalfa sprout ameliorates disease severity of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice. *Lupus*, 18, 206-15.
- Hui, D. Y. & J. A. Harmony (1980) Inhibition of Ca²⁺ accumulation in mitogen-activated lymphocytes: role of membrane-bound plasma lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 4764-8.
- Hui, D. Y., J. A. Harmony, T. L. Innerarity & R. W. Mahley (1980) Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apoprotein E and apoprotein B. *J Biol Chem*, 255, 11775-81.
- Iglesias, M., J. Postigo, I. Santiuste, J. Gonzalez, L. Buelta, E. Tamayo, J. Merino & R. Merino (2013) p27(Kip1) inhibits systemic autoimmunity through the control of Treg cell activity and differentiation. *Arthritis Rheum*, 65, 343-54.
- Iwashige, K., K. Kouda, M. Kouda, K. Horiuchi, M. Takahashi, A. Nagano, T. Tanaka & H. Takeuchi (2004) Calorie restricted diet and urinary pentosidine in patients with rheumatoid arthritis. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*, 23, 19-24.
- Javierre, B. M., M. Esteller & E. Ballestar (2008) Epigenetic connections between autoimmune disorders and haematological malignancies. *Trends Immunol*, 29, 616-23.
- Jofre-Monseny, L., A. M. Minihane & G. Rimbach (2008) Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res*, 52, 131-45.
- Joseph, J., S. Bittner, F. M. Kaiser, H. Wiendl & S. Kissler (2012) IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol*, 188, 216-21.
- Jousilahti, P., E. Vartiainen, J. Tuomilehto & P. Puska (1999) Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*, 99, 1165-72.
- Kalla, A. A. & M. Tikly (2003) Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 17, 863-75.
- Karussis, D., D. M. Michaelson, N. Grigoriadis, A. D. Korezyn, R. Mizrachi-Koll, S. Chapman, O. Abramsky & J. Chapman (2003) Lack of apolipoprotein-E exacerbates experimental allergic encephalomyelitis. *Mult Scler*, 9, 476-80.
- Kelchtermans, H., E. Schurgers, L. Geboes, T. Mitera, J. Van Damme, J. Van Snick, C. Uyttenhove & P. Matthys (2009) Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon-gamma and counteraction by interferon-gamma. *Arthritis Res Ther*, 11, R122.

- Kelly, M. E., M. A. Clay, M. J. Mistry, H. M. Hsieh-Li & J. A. Harmony (1994) Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol*, 159, 124-39.
- Khallou-Laschet, J., E. Tupin, G. Caligiuri, B. Poirier, N. Thieblemont, A. T. Gaston, M. Vandaele, J. Bleton, A. Tchapla, S. V. Kaveri, M. Rudling & A. Nicoletti (2006) Atheroprotective effect of adjuvants in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*, 184, 330-41.
- Kim, J., J. M. Basak & D. M. Holtzman (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63, 287-303.
- Kim, S. H., C. K. Lee, E. Y. Lee, S. Y. Park, Y. S. Cho, B. Yoo & H. B. Moon (2004) Serum oxidized low-density lipoproteins in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 24, 230-3.
- Klack, K., E. Bonfa & E. F. Borba Neto (2012) Diet and nutritional aspects in systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol*, 52, 384-408.
- Klareskog, L., P. Stolt, K. Lundberg, H. Kallberg, C. Bengtsson, J. Grunewald, J. Ronnelid, H. E. Harris, A. K. Ulfgren, S. Rantapaa-Dahlqvist, A. Eklund, L. Padyukov & L. Alfredsson (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*, 54, 38-46.
- Klingenberg, R., D. F. Ketelhuth, D. Strodthoff, S. Gregori & G. K. Hansson (2012) Subcutaneous immunization with heat shock protein-65 reduces atherosclerosis in Apoe(-)/(-) mice. *Immunobiology*, 217, 540-7.
- Kockx, M., W. Jessup & L. Kritharides (2008) Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 1060-7.
- Korman, B. D., M. I. Alba, J. M. Le, I. Alevizos, J. A. Smith, N. P. Nikolov, D. L. Kastner, E. F. Remmers & G. G. Illei (2008) Variant form of STAT4 is associated with primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun*, 9, 267-70.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig & H. von Boehmer (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*, 6, 1219-27.
- Ku, I. A., J. B. Imboden, P. Y. Hsue & P. Ganz (2009) Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis. *Circ J*, 73, 977-85.
- Kumar, H., T. Kawai & S. Akira (2011a) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30, 16-34.
- Kumar, V., S. J. Butcher, K. Oorni, P. Engelhardt, J. Heikkonen, K. Kaski, M. Ala-Korpela & P. T. Kovanen (2011b) Three-dimensional cryoEM reconstruction of native LDL particles to 16A resolution at physiological body temperature. *PLoS One*, 6, e18841.
- Kurasawa, K., K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, K. Takabayashi & I. Iwamoto (2000) Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 43, 2455-63.
- Laffitte, B. A., J. J. Repa, S. B. Joseph, D. C. Wilpitz, H. R. Kast, D. J. Mangelsdorf & P. Tontonoz (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 507-12.
- Larche, M., C. A. Akdis & R. Valenta (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6, 761-71.
- Laskowitz, D. T., D. M. Lee, D. Schmechel & H. F. Staats (2000) Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*, 41, 613-20.
- Lee, S. I., S. Y. Lee & W. H. Yoo (2005) Association of apolipoprotein E polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 44, 1067-8.
- Leiba, A., H. Amital, M. E. Gershwin & Y. Shoenfeld (2001) Diet and lupus. *Lupus*, 10, 246-8.

- Li, F. Q., G. D. Sempowski, S. E. McKenna, D. T. Laskowitz, C. A. Colton & M. P. Vitek (2006) Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 956-65.
- Li, H., S. B. Willingham, J. P. Ting & F. Re (2008a) Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol*, 181, 17-21.
- Li, L., J. Kim & V. A. Boussiotis (2010) IL-1 β -mediated signals preferentially drive conversion of regulatory T cells but not conventional T cells into IL-17-producing cells. *J Immunol*, 185, 4148-53.
- Li, L., P. A. Thompson & R. L. Kitchens (2008b) Infection induces a positive acute phase apolipoprotein E response from a negative acute phase gene: role of hepatic LDL receptors. *J Lipid Res*, 49, 1782-93.
- Littman, D. R. & A. Y. Rudensky (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 140, 845-58.
- Liu-Bryan, R. (2010) Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome. *Immunol Cell Biol*, 88, 20-3.
- Liu, M. L., R. Scalia, J. L. Mehta & K. J. Williams (2012) Cholesterol-induced membrane microvesicles as novel carriers of damage-associated molecular patterns: mechanisms of formation, action, and detoxification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2113-21.
- Lubberts, E., M. I. Koenders, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, C. J. Coenen-de Roo, L. A. Joosten & W. B. van den Berg (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum*, 50, 650-9.
- Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma & B. Xia (2012) CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135.
- Lund-Katz, S. & M. C. Phillips (2010) High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem*, 51, 183-227.
- Lynch, J. R., W. Tang, H. Wang, M. P. Vitek, E. R. Bennett, P. M. Sullivan, D. S. Warner & D. T. Laskowitz (2003) APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem*, 278, 48529-33.
- Maezawa, I., M. Nivison, K. S. Montine, N. Maeda & T. J. Montine (2006) Neurotoxicity from innate immune response is greatest with targeted replacement of E4 allele of apolipoprotein E gene and is mediated by microglial p38MAPK. *FASEB J*, 20, 797-9.
- Mahley, R. W., T. L. Innerarity, S. C. Rall, Jr. & K. H. Weisgraber (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*, 25, 1277-94.
- Mallat, Z., A. Gojova, V. Brun, B. Esposito, N. Fournier, F. Cottrez, A. Tedgui & H. Groux (2003) Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, 108, 1232-7.
- Manel, N., D. Unutmaz & D. R. Littman (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ mat. *Nat Immunol*, 9, 641-9.
- Manoury-Schwartz, B., G. Chiochia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M. C. Boissier & C. Fournier (1997) High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- γ receptors. *J Immunol*, 158, 5501-6.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani & M. Locati (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 13, 453-61.
- Matsuura, E., K. Kobayashi, Y. Matsunami, L. Shen, N. Quan, M. Makarova, S. V. Suchkov, K. Ayada, K. Oguma & L. R. Lopez (2009) Autoimmunity, infectious immunity, and atherosclerosis. *J Clin Immunol*, 29, 714-21.
- Matsuura, E., K. Kobayashi, M. Tabuchi & L. R. Lopez (2006) Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res*, 45, 466-86.

- Matthys, P., K. Vermeire, T. Mitera, H. Heremans, S. Huang & A. Billiau (1998) Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol*, 28, 2143-51.
- Matzinger, P. & T. Kamala (2011) Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol*, 11, 221-30.
- Maverakis, E., Y. Miyamura, M. P. Bowen, G. Correa, Y. Ono & H. Goodarzi (2010) Light, including ultraviolet. *J Autoimmun*, 34, J247-57.
- McMahon, M., J. Grossman, J. Fitzgerald, E. Dahlin-Lee, D. J. Wallace, B. Y. Thong, H. Badsha, K. Kalunian, C. Charles, M. Navab, A. M. Fogelman & B. H. Hahn (2006) Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54, 2541-9.
- Meune, C., E. Touzé, L. Trinquart & Y. Allanore (2009) Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology*, 48, 1309-1313.
- Michaud, K. & F. Wolfe (2007) Comorbidities in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 21, 885-906.
- Mistry, M. J., M. A. Clay, M. E. Kelly, M. A. Steiner & J. A. Harmony (1995) Apolipoprotein E restricts interleukin-dependent T lymphocyte proliferation at the G1A/G1B boundary. *Cell Immunol*, 160, 14-23.
- Miyata, M. & J. D. Smith (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet*, 14, 55-61.
- Movva, R. & D. J. Rader (2008) Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem*, 54, 788-800.
- Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg & H. Cheroutre (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317, 256-60.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick & D. J. Cua (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 198, 1951-7.
- Murphy, K. M. & S. L. Reiner (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*, 2, 933-44.
- Nadkarni, S., C. Mauri & M. R. Ehrenstein (2007) Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med*, 204, 33-9.
- Nelson, D. & M. Cox. 2007. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Editorial Omega.
- Notley, C. A., J. J. Inglis, S. Alzabin, F. E. McCann, K. E. McNamee & R. O. Williams (2008) Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med*, 205, 2491-7.
- Nurmohamed, M. T. (2009) Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 8, 663-7.
- Okamoto, K. & H. Takayanagi (2011) Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol*, 11, 543-8.
- Ophir, G., N. Amariglio, J. Jacob-Hirsch, R. Elkon, G. Rechavi & D. M. Michaelson (2005) Apolipoprotein E4 enhances brain inflammation by modulation of the NF-kappaB signaling cascade. *Neurobiol Dis*, 20, 709-18.
- Palmer, G., D. Talabot-Ayer, C. Lamacchia, D. Toy, C. A. Seemayer, S. Viatte, A. Finckh, D. E. Smith & C. Gabay (2009) Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 60, 738-49.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian & C. Dong (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6, 1133-41.

- Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer & D. J. Mangelsdorf (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 93, 693-704.
- Petri, M. (2001) Diet and systemic lupus erythematosus: from mouse and monkey to woman? *Lupus*, 10, 775-7.
- Pham, T., A. Kodvawala & D. Y. Hui (2005) The receptor binding domain of apolipoprotein E is responsible for its antioxidant activity. *Biochemistry*, 44, 7577-82.
- Piccinini, A. M. & K. S. Midwood (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*, 2010.
- Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, J. R. Hagaman, P. M. Oliver & N. Maeda (1992) Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4471-5.
- Pieringer, H. & M. Pichler (2011) Cardiovascular morbidity and mortality in patients with rheumatoid arthritis: vascular alterations and possible clinical implications. *QJM*, 104, 13-26.
- Podrez, E. A. (2010) Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37, 719-25.
- Raffai, R. L. (2012) Apolipoprotein E regulation of myeloid cell plasticity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 23, 471-8.
- Remmers, E. F., R. M. Plenge, A. T. Lee, R. R. Graham, G. Hom, T. W. Behrens, P. I. de Bakker, J. M. Le, H. S. Lee, F. Batliwalla, W. Li, S. L. Masters, M. G. Booty, J. P. Carulli, L. Padyukov, L. Alfredsson, L. Klareskog, W. V. Chen, C. I. Amos, L. A. Criswell, M. F. Seldin, D. L. Kastner & P. K. Gregersen (2007) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 357, 977-86.
- Riddell, D. R., A. Graham & J. S. Owen (1997) Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem*, 272, 89-95.
- Roosbeek, S., B. Vanloo, N. Duverger, H. Caster, J. Breyne, I. De Beun, H. Patel, J. Vandekerckhove, C. Shoulders, M. Rosseneu & F. Peelman (2001) Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res*, 42, 31-40.
- Rose, S., M. Eren, S. Murphy, H. Zhang, C. S. Thaxton, J. Chowaniec, E. A. Waters, T. J. Meade, D. E. Vaughan & H. Perlman (2012) A novel mouse model that develops spontaneous arthritis and is predisposed towards atherosclerosis. *Ann Rheum Dis*.
- Roselaar, S. E. & A. Daugherty (1998) Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res*, 39, 1740-3.
- Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D. J. Cua & H. Takayanagi (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 203, 2673-82.
- Schaefer, J. R. (2009) Unraveling hyperlipidemia type III (dysbetalipoproteinemia), slowly. *Eur J Hum Genet*, 17, 541-2.
- Schottelius, A. J., L. L. Moldawer, C. A. Dinarello, K. Asadullah, W. Sterry & C. K. Edwards, 3rd (2004) Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol*, 13, 193-222.
- Shi, J., C. B. Zhao, T. L. Vollmer, T. M. Tyry & S. M. Kuniyoshi (2008) APOE epsilon 4 allele is associated with cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 70, 185-90.
- Shih, S. J., C. Allan, S. Grehan, E. Tse, C. Moran & J. M. Taylor (2000) Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue. *J Biol Chem*, 275, 31567-72.
- Shore, V. G. & B. Shore (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*, 12, 502-7.

- Singh, A. K., M. T. Wilson, S. Hong, D. Olivares-Villagomez, C. Du, A. K. Stanic, S. Joyce, S. Sriram, Y. Koezuka & L. Van Kaer (2001) Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 194, 1801-11.
- Skorka, A., T. Bednarczuk, E. Bar-Andziak, J. Nauman & R. Ploski (2005) Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 62, 679-82.
- Smith, E., K. M. Prasad, M. Butcher, A. Dobrian, J. K. Kolls, K. Ley & E. Galkina (2010) Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 121, 1746-55.
- Smyth, D., J. D. Cooper, J. E. Collins, J. M. Heward, J. A. Franklyn, J. M. Howson, A. Vella, S. Nutland, H. E. Rance, L. Maier, B. J. Barratt, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D. A. Savage, D. B. Dunger, B. Widmer, D. P. Strachan, S. M. Ring, N. Walker, D. G. Clayton, R. C. Twells, S. C. Gough & J. A. Todd (2004) Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*, 53, 3020-3.
- Stastny, P. (1976) Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 57, 1148-57.
- Stavropoulos-Kalinoglou, A., G. S. Metsios, Y. Koutedakis & G. D. Kitas (2011) Obesity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 50, 450-62.
- Stavropoulos-Kalinoglou, A., G. S. Metsios, V. F. Panoulas, P. Nightingale, Y. Koutedakis & G. D. Kitas (2012) Anti-tumour necrosis factor alpha therapy improves insulin sensitivity in normal-weight but not in obese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 14, R160.
- Stuart, J. M., A. S. Townes & A. H. Kang (1985) Type II collagen-induced arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 460, 355-62.
- Taleb, S., A. Tedgui & Z. Mallat (2010) Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol*, 10, 197-202.
- Tanimoto, N., Y. Kumon, T. Suehiro, S. Ohkubo, Y. Ikeda, K. Nishiya & K. Hashimoto (2003) Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sciences*, 72, 2877-2885.
- Taylor, K. E., E. F. Remmers, A. T. Lee, W. A. Ortmann, R. M. Plenge, C. Tian, S. A. Chung, J. Nititham, G. Hom, A. H. Kao, F. Y. Demirci, M. I. Kamboh, M. Petri, S. Manzi, D. L. Kastner, M. F. Seldin, P. K. Gregersen, T. W. Behrens & L. A. Criswell (2008) Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*, 4, e1000084.
- Teige, A., I. Teige, S. Lavasani, R. Bockermann, E. Mondoc, R. Holmdahl & S. Issazadeh-Navikas (2004) CD1-dependent regulation of chronic central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 172, 186-94.
- Tenger, C. & X. Zhou (2003) Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigen-presenting cell. *Immunology*, 109, 392-7.
- Terkeltaub, R. A., C. A. Dyer, J. Martin & L. K. Curtiss (1991) Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo. *J Clin Invest*, 87, 20-6.
- Tesseur, I., H. Zhang, W. Brecht, J. Corn, J. S. Gong, K. Yanagisawa, M. Michikawa, K. Weisgraber, Y. Huang & T. Wyss-Coray (2009) Bioactive TGF-beta can associate with lipoproteins and is enriched in those containing apolipoprotein E3. *J Neurochem*, 110, 1254-62.
- van den Berg, W. B. & P. Miossec (2009) IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 5, 549-53.
- van Halm, V. P., M. M. Nielen, M. T. Nurmohamed, D. van Schaardenburg, H. W. Reesink, A. E. Voskuyl, J. W. Twisk, R. J. van de Stadt, M. H. de Koning, M. R. Habibu, I. E. van der Horst-Bruinsma & B. A. Dijkmans (2007) Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 66, 184-8.

- Van Lenten, B. J., A. C. Wagner, D. P. Nayak, S. Hama, M. Navab & A. M. Fogelman (2001) High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation*, 103, 2283-8.
- Van Oosten, M., P. C. Rensen, E. S. Van Amersfoort, M. Van Eck, A. M. Van Dam, J. J. Breve, T. Vogel, A. Panet, T. J. Van Berkel & J. Kuiper (2001) Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem*, 276, 8820-4.
- Vandiedonck, C., C. Capdevielle, M. Giraud, S. Krumeich, J. P. Jais, B. Eymard, C. Tranchant, P. Gajdos & H. J. Garchon (2006) Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 59, 404-7.
- Vaudo, G., S. Marchesi, R. Gerli, R. Allegrucci, A. Giordano, D. Siepi, M. Pirro, Y. Shoenfeld, G. Schillaci & E. Mannarino (2004) Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis*, 63, 31-5.
- Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau & P. Matthys (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol*, 158, 5507-13.
- Vogel, T., N. H. Guo, R. Guy, N. Drezlich, H. C. Krutzsch, D. A. Blake, A. Panet & D. D. Roberts (1994) Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation. *J Cell Biochem*, 54, 299-308.
- Wan, Y. Y. & R. A. Flavell (2006) The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev*, 212, 114-30.
- Wang, B., I. Andre, A. Gonzalez, J. D. Katz, M. Aguet, C. Benoist & D. Mathis (1997) Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13844-9.
- Weber, C. & H. Noels (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17, 1410-22.
- Weiner, G. J. (2000) The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol*, 68, 455-63.
- Wooley, P. H. & J. M. Chapedelaine (1987) Immunogenetics of collagen-induced arthritis. *Crit Rev Immunol*, 8, 1-22.
- Wooley, P. H., H. S. Luthra, M. M. Griffiths, J. M. Stuart, A. Huse & C. S. David (1985) Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule. *J Immunol*, 135, 2443-51.
- Wooley, P. H., H. S. Luthra, J. M. Stuart & C. S. David (1981) Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med*, 154, 688-700.
- Wu, R. & R. Li (2012) Propylthiouracil-induced autoimmune syndromes: 11 case report. *Rheumatol Int*, 32, 679-81.
- Xie, J. J., J. Wang, T. T. Tang, J. Chen, X. L. Gao, J. Yuan, Z. H. Zhou, M. Y. Liao, R. Yao, X. Yu, D. Wang, Y. Cheng, Y. H. Liao & X. Cheng (2010) The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine*, 49, 185-93.
- Xu, L., A. Kitani, I. Fuss & W. Strober (2007) Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*, 178, 6725-9.
- Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo & D. A. Hafler (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*, 454, 350-2.
- Yoshimoto, T., A. Bendelac, C. Watson, J. Hu-Li & W. E. Paul (1995) Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science*, 270, 1845-7.
- Zernecke, A. & C. Weber (2010) Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 86, 192-201.
- Zhang, G. X., S. Yu, B. Gran, J. Li, I. Siglienti, X. Chen, D. Calida, E. Ventura, M. Kamoun & A. Rostami (2003) Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 171, 4485-92.

- Zhang, H., L. M. Wu & J. Wu (2011) Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm*, 2011, 949072.
- Zhang, H. L., J. Wu & J. Zhu (2010) The immune-modulatory role of apolipoprotein E with emphasis on multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Dev Immunol*, 2010, 186813.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, B. Burkey & N. Maeda (1994) Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest*, 94, 937-45.
- Zhu, J. & W. E. Paul (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112, 1557-69.
- Zhu, Y. & D. Y. Hui (2003) Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem*, 278, 36257-63.

Anexo I:
Publicaciones
derivadas de este trabajo
de tesis

Exacerbation of Type II Collagen–Induced Arthritis in Apolipoprotein E–Deficient Mice in Association With the Expansion of Th1 and Th17 Cells

Jorge Postigo,¹ Fernanda Genre,¹ Marcos Iglesias,² Maigualida Fernández-Rey,¹ Luis Buelta,³ José Carlos Rodríguez-Rey,¹ Jesús Merino,¹ and Ramón Merino⁴

Objective. To explore the bidirectional relationship between the development of rheumatoid arthritis (RA) and atherosclerosis using bovine type II collagen (CII)–immunized B10.RIII apoE^{−/−} mice, a murine model of spontaneous atherosclerosis and collagen-induced arthritis (CIA).

Methods. Male B10.RIII apoE^{−/−} mice and wild-type controls were immunized with 150 μ g of CII emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA). The clinical, radiologic, and histopathologic severity of CIA, the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies, the expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the joints, and the percentages of Th1, Th17, and Treg lymphocytes in the draining lymph nodes were evaluated during CIA induction. In addition, the size of atherosclerotic lesions was assessed in these mice 8 weeks after CIA induction.

Results. B10.RIII apoE^{−/−} mice that were immunized with CII and CFA developed an exacerbated CIA that was accompanied by increased joint expression of

multiple proinflammatory cytokines and by the expansion in the draining lymph nodes of Th1 and Th17 cells. In contrast, the size of vascular lesions in B10.RIII apoE^{−/−} mice was not affected by the development of CIA.

Conclusion. Our findings indicate that a deficiency in apolipoprotein E and/or its consequences in cholesterol metabolism act as accelerating factors in autoimmunity by promoting Th1 and Th17 inflammatory responses.

Rheumatoid arthritis (RA), a chronic autoimmune disease that results in joint inflammation and destruction, is associated with an increased risk of cardiovascular disease due to accelerated atherosclerosis (1,2). The inflammatory environment associated with RA, rather than traditional cardiovascular risk factors, has been postulated to be implicated in the accelerated atherosclerosis in these patients (3). In addition, an association between active RA and altered lipid profiles in plasma, manifested by low levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, a high ratio of total cholesterol to HDL cholesterol, and high levels of triglyceride, has been established (4–6). These unfavorable lipid changes may already be present at least 10 years before the onset of RA (7), suggesting their potential involvement in the initiation and/or activity of this systemic autoimmune disease. In fact, HDL not only participates in the reverse transport of cholesterol, promoting cellular cholesterol efflux from peripheral cells to the liver for excretion, but also possesses antiinflammatory properties, including its ability to protect low-density lipoprotein (LDL) from oxidation (8–11). However, the notion of a mechanistic relationship between altered plasma lipid profiles and active RA lacks appropriate experimental evidence in well-defined animal models.

Dr. Genre's work was supported by a predoctoral fellowship from the Instituto Danone, Spain. Dr. J. Merino's work was supported by grant BFU2009-07206 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. Dr. R. Merino's work was supported by grant SAF2008-02042 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, and the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Spain.

¹Jorge Postigo, BS, Fernanda Genre, BS, Maigualida Fernández-Rey, BS, José Carlos Rodríguez-Rey, PhD, Jesús Merino, MD, PhD: Universidad de Cantabria-IFIMAV, Santander, Spain; ²Marcos Iglesias, BS: Universidad de Cantabria-IFIMAV and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria/CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain; ³Luis Buelta, MD, PhD: Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ⁴Ramón Merino, MD, PhD: Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria/CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain.

Address correspondence to Ramón Merino, MD, PhD, IBBTEC, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. E-mail: merinor@unican.es.

Submitted for publication July 8, 2010; accepted in revised form December 21, 2010.

Mice deficient in apolipoprotein E (apoE^{-/-} mice) constitute an excellent animal model in which to explore the metabolic and immunologic mechanisms involved in atherosclerosis (12,13). These mice spontaneously develop atherosclerosis in a time- and diet-dependent manner in association with reduced levels of HDL cholesterol and increased levels of total cholesterol and LDL cholesterol in plasma. Immunization of susceptible strains of mice, such as B10.RIII (H-2^r) mice, with bovine type II collagen (CII) emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA) results in the development of a destructive inflammatory joint disease resembling human RA (14). Both atherosclerosis in apoE^{-/-} mice and CII-induced arthritis (CIA) in predisposed animals are mediated by a particular functional subpopulation of antigen-driven CD4⁺ cells, termed Th17 cells, that produce interleukin-6 (IL-6), IL-17A, and IL-21 cytokines (15–19). In fact, blockade of IL-17A results in reduced atherosclerosis in apoE^{-/-} mice, and animals with impaired Th17 differentiation develop an attenuated form of CIA (13,17,18).

In the present study, we used B10.RIII apoE^{-/-} mice immunized with bovine CII and CFA to investigate whether the proinflammatory and/or metabolic alterations that are involved in the pathogenesis of each process separately collaborate in promoting an accelerated atherosclerosis and/or arthritis. Unlike the results of a recent study of C57BL/6 apoE^{-/-} (B6.apoE^{-/-}) mice immunized with chicken CII and CFA (20), our results demonstrated that B10.RIII apoE^{-/-} mice develop accelerated and exacerbated CIA after immunization with CII and CFA. This enhanced severity was accompanied by increased expression of multiple proinflammatory cytokines in mouse joints and by the expansion of Th1 and Th17 cells in the draining lymph nodes. In contrast, the intensity of vascular lesions in B10.RIII apoE^{-/-} mice immunized with CII and CFA was not affected by the development of CIA.

MATERIALS AND METHODS

Mice. B6.apoE^{-/-} (H-2^b) and B10.RIII (H-2^r) mice were purchased from Charles River and Harlan Iberica, respectively. B10.RIII apoE^{-/-} mice were generated in our animal facilities by backcrossing B6.apoE^{-/-} mice with B10.RIII mice for 10 generations. At the second backcross generation, H-2^{r/r} mice were selected by flow cytometry using specific monoclonal antibodies (mAb) against H-2^b and H-2^r (BD Biosciences). At the tenth backcross generation, male and female B10.RIII apoE^{+/-} mice were intercrossed, and the resulting apoE^{-/-} homozygous mice were selected by polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA extracted from mouse tails. Mice were fed a normal chow diet ad libitum and

were bled from the retroorbital plexus 8 weeks after immunization. All experiments with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee.

Induction and assessment of arthritis. Bovine CII (provided by Dr. Marie Griffiths, University of Utah, Salt Lake City, UT) was dissolved at a concentration of 2 mg/ml in 0.05M acetic acid and emulsified with CFA containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Bioproducts). For the induction of CIA, 8–12-week-old male mice were immunized once at the base of the tail with 150 µg of antigen in a final volume of 150 µl. In some experiments, mice injected with phosphate buffered saline (PBS) and CFA were used as CIA-negative controls. A clinical evaluation of arthritis severity was performed as described previously (21).

Radiologic studies were performed using a CCX x-ray source of 70 kV, with an exposure time of 90 msec (Trophy Irix X-Ray System; Kodak Spain) and Trophy RVG Digital Imaging System, as previously described (21). Radiologic images were graded for the presence of the following 4 different radiologic lesions: soft tissue swelling, juxtaarticular osteopenia due to alterations in bone density, joint space narrowing or disappearance, and bone surface irregularities due to marginal erosions and/or periosteal new bone formation. The extent of each individual lesion in each paw was graded on a scale of 0–2, where 0 = absent, 1 = local (affecting 1 digit or 1 joint in the carpus), and 2 = diffuse (affecting ≥2 digits and/or ≥2 joints in the carpus).

Mice were killed 8 weeks after immunization, and the hind paws were fixed in 10% phosphate buffered formaldehyde solution and decalcified overnight in Parengy's decalcification solution. The tissue was then embedded in paraffin. Sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), examined under a light phase microscope, and scored on a scale of 0–3 as described previously (22).

Serologic analysis. Levels of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL and very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol combined, and triglycerides in mouse serum samples were determined using enzymatic assays (cholesterol assay kit [BioVision] and Triglyceride-LQ assay [Spinreact]) according to the recommendations of the manufacturer. Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (23). Results were expressed in titration units in reference to a standard curve obtained from a serum pool from CII-CFA-immunized DBA/1 mice. Serum levels of total IgG1 and IgG2a were determined by ELISA as previously described (24). Results were expressed in mg/ml in reference to a standard curve obtained with a mouse reference serum (MP Biomedicals).

Flow cytometric analysis. The percentages of Th1 and Th17 cells in the draining lymph nodes of B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice before and 3 weeks after immunization with CII-CFA were determined by flow cytometry. Intracellular cytokine staining was performed using an intracellular staining kit (BD Biosciences). Lymphocytes from paraaortic lymph nodes were stimulated for 6 hours with phorbol myristate acetate (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in the presence of GolgiStop solution (BD Biosciences) and stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-interferon-γ

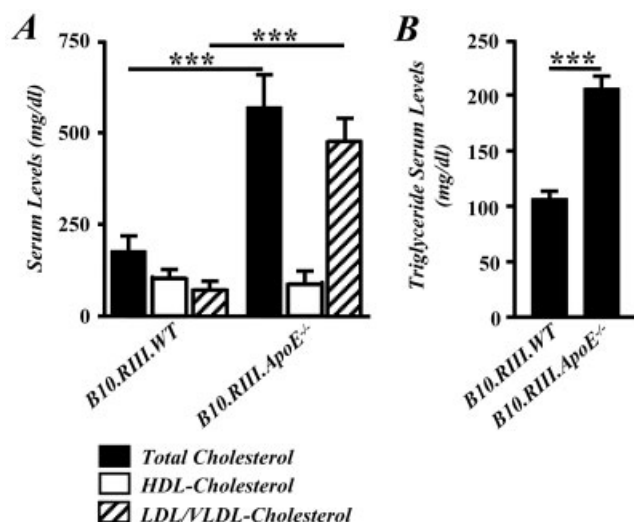


Figure 1. Serum lipid profiles in B10.RIII apoE^{-/-} mice during development of collagen-induced arthritis (CIA). Levels of **A**, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and the combination of low-density lipoprotein (LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol and **B**, triglycerides in the sera of male B10.RIII wild-type (WT) and B10.RIII apoE^{-/-} mice were determined 8 weeks after induction of CIA. The lower limit of detection was 0.5 mg/dl in both **A** and **B**. Representative results from 3 independent experiments are shown. Values are the mean $\pm$ SD ($n = 8$ –10 animals per group). *** = $P < 0.001$.

(anti-IFN γ) or PE-conjugated anti-IL-17 (all antibodies from BD Biosciences). A PE-conjugated IgG2a irrelevant antibody was used as an isotype control for cytokine staining. The percentages of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells were determined at the same time points by flow cytometry using conjugated mAb, as described previously (21). A total of 5×10^4 viable cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analyses. Total RNA was obtained from mouse joints by TRIzol extraction (Invitrogen Life Technologies). One microgram of the isolated RNA was used for complementary DNA synthesis using an RT-PCR kit according to the recommendations of the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech). Real-time quantitative RT-PCR was performed on an MX-3000P Stratagene instrument (Agilent Technologies) using specific TaqMan expression assays and universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Life Technologies). Results (in triplicate) were normalized to GAPDH expression and measured in parallel in each sample. Data were expressed as the mean fold change relative to control samples.

Evaluation of atherosclerosis. The extent of atherosclerosis was quantified as previously described (25). Briefly, 8–10 sections (5 μ m) obtained at 50- μ m intervals from paraffin-embedded aortic sinus of PBS-CFA-immunized and CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice were stained with H&E. Lesion size was determined by computer-assisted morphometry and expressed as the percentage of the surface area of the aorta occupied by lesions according to the following

formula: $(\Sigma \text{ area of lesion} / \Sigma \text{ total internal perimeter of the aorta}) \times 100$. For cellular characterization of atherosclerotic lesions, macrophages were detected by immunohistochemistry using a biotin-labeled rat anti-Mac2 mAb (clone M3/38; Cedarlane Laboratories), followed by streptavidin–horseradish peroxidase (BD Biosciences), and diaminobenzidine substrate (Dako Diagnostics). Specimens were counterstained with hematoxylin. Staining with anti-Mac-2 was expressed as the percentage of stained surface area within the lesions (anti-Mac-2–stained surface/total lesion surface $\times 100$), as previously described (26).

Statistical analysis. Statistical analysis of the differences between groups of mice was performed by Mann-Whitney test. P values less than 0.05 were considered significant.

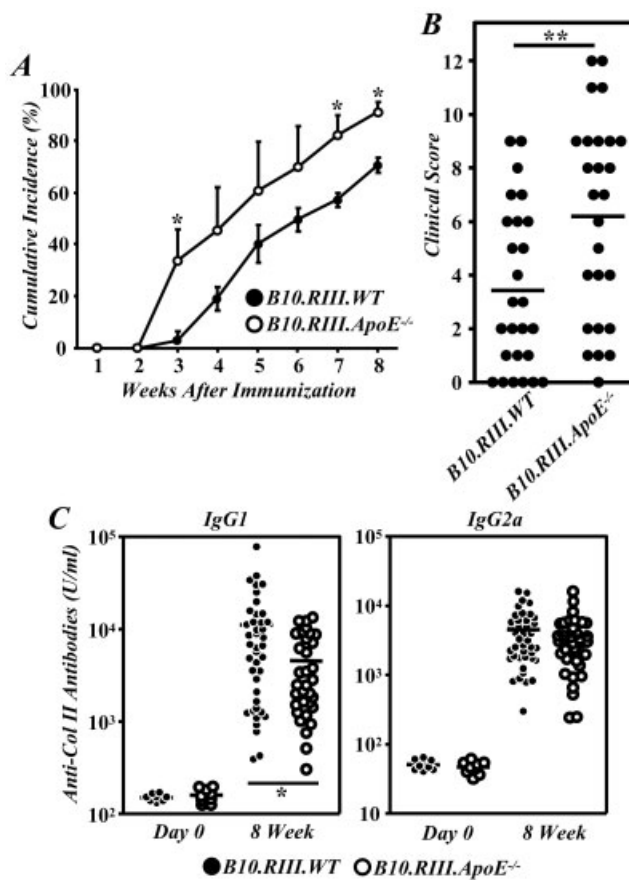


Figure 2. Exacerbated clinical signs and altered anti-type II collagen (anti-Col II [anti-CII]) antibody responses in B10.RIII apoE^{-/-} mice developing collagen-induced arthritis (CIA). Male B10.RIII wild-type (WT) and B10.RIII apoE^{-/-} mice (8–12 weeks old) were immunized with CII and Freund's complete adjuvant (CFA). **A**, Cumulative incidence of CIA. Values are the mean $\pm$ SD percentage of affected mice at the indicated week after immunization ($n = 26$ mice per group). **B**, Clinical severity of CIA 8 weeks after immunization with CII-CFA. **C**, Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies before and 8 weeks after immunization with CII-CFA. In **B** and **C**, circles represent individual mice and horizontal lines represent the mean. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$.

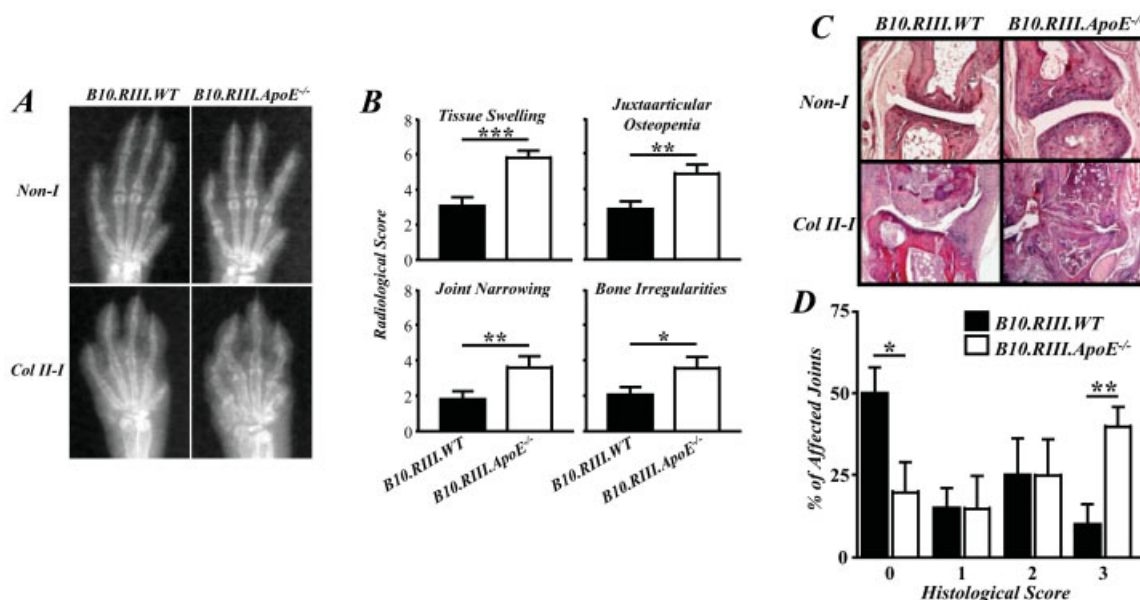


Figure 3. Exacerbated radiologic and histopathologic lesions in B10.RIII apoE^{-/-} mice during development of CIA. Male B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (8–12 weeks old) were immunized with CII and CFA. **A**, Representative radiologic images of the front paws of nonimmunized (non-I) B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice and B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA (Col II-I). **B**, Scores for 4 individual radiologic signs in B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice. Representative results from 3 independent experiments are shown. Values are the mean $\pm$ SD ($n = 20$ – 25 animals per group). **C**, Histologic sections of the joints of representative nonimmunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice and B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA. Original magnification $\times 10$. **D**, Histologic score in the joints 8 weeks after immunization with CII-CFA. Representative results from 3 independent experiments are shown. Values are the mean $\pm$ SD percentage of joints in each severity group ($n = 20$ – 25 animals per group). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.005$. See Figure 2 for other definitions.

RESULTS

Development of severe CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice. To explore whether the deficiency in apoE influenced the clinical progression of CIA in B10.RIII mice, we immunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice with CII-CFA. We first analyzed serum lipid profiles in these groups of mice 8 weeks after immunization. As expected (13), immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice had higher circulating levels of total cholesterol and triglycerides than B10.RIII wild-type mice ($P < 0.001$) (Figures 1A and B). The elevated cholesterol levels in these mice were basically due to the increase in the LDL and VLDL cholesterol fraction, since the levels of serum HDL cholesterol were essentially identical in both groups of mice (Figure 1). The circulating lipid profiles detected in B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA were similar to those observed before immunization (data not shown). Based on these results and to avoid additional metabolic alterations introduced

by hypercholesterolemic diets, we decided to perform all of the experiments in mice fed a normal chow diet.

We next compared the development of CIA in B10.RIII wild-type mice with that in B10.RIII apoE^{-/-} mice. Unlike findings described in previous reports (20), we found that B10.RIII apoE^{-/-} mice developed more accelerated CIA than B10.RIII wild-type mice and exhibited an increased cumulative incidence throughout the 8-week period of observation (Figure 2A). In addition, the clinical severity of CIA 8 weeks after CII-CFA immunization was significantly higher in B10.RIII apoE^{-/-} mice than in B10.RIII wild-type mice (Figure 2B). Consistent with the clinical findings, the severity of each radiologic sign considered in the present study (soft tissue swelling, juxtaarticular osteopenia, narrowing or disappearance of the interosseous spaces reflecting cartilage loss, and bone irregularities secondary to periosteal new bone formation and/or marginal articular erosions) was significantly higher in B10.RIII

apoE^{-/-} mice than in B10.RIII wild-type mice (Figures 3A and B). In histologic analyses, joints from B10.RIII apoE^{-/-} mice more frequently showed signs of severe autoimmune arthritis, such as widespread infiltration of inflammatory cells, pannus formation, cartilage destruction, and bone erosion (Figures 3C and D).

Altered anti-CII antibody production in B10.RIII apoE^{-/-} mice. The intensity and quality of anti-CII humoral immune responses in B10.RIII wild-type mice was compared with that in B10.RIII apoE^{-/-} mice by analyzing the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies. Both groups of mice exhibited strong anti-CII antibody responses 8 weeks after CIA induction (Figure 2C). However, qualitative differences in these antibody responses were observed between B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice. Thus, whereas serum levels of IgG2a anti-CII antibodies were similar in both groups of mice, the titers of IgG1 anti-CII antibodies were significantly reduced in B10.RIII apoE^{-/-} mice (Figure 2C). The altered anti-CII humoral immune response was antigen specific, since the

levels of circulating total IgG1 and IgG2a antibodies 8 weeks after CIA induction were similar in B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (mean $\pm$ SD serum levels of total IgG1 antibodies 0.9 ± 0.4 mg/ml in B10.RIII wild-type mice and 1.1 ± 0.3 mg/ml in B10.RIII apoE^{-/-} mice; mean $\pm$ SD serum levels of total IgG2a antibodies 3.6 ± 1.1 mg/ml in B10.RIII wild-type mice and 3.1 ± 1.7 mg/ml in B10.RIII apoE^{-/-} mice; $P > 0.5$ for both comparisons).

Increased expression of proinflammatory cytokines in the joints and expansion of Th1 and Th17 cells in B10.RIII apoE^{-/-} mice. The exacerbated development of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice, together with the reduction in the levels of circulating IgG1 anti-CII antibodies compared with B10.RIII wild-type mice, prompted us to explore by real-time quantitative RT-PCR the pattern of cytokine expression in the joints during the induction of CIA in these strains of mice. As expected (27), a significant increase in the expression of the arthritogenic IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF α), and IL-6 transcripts was observed in the joints of B10.RIII wild-type mice 8 weeks after immunization

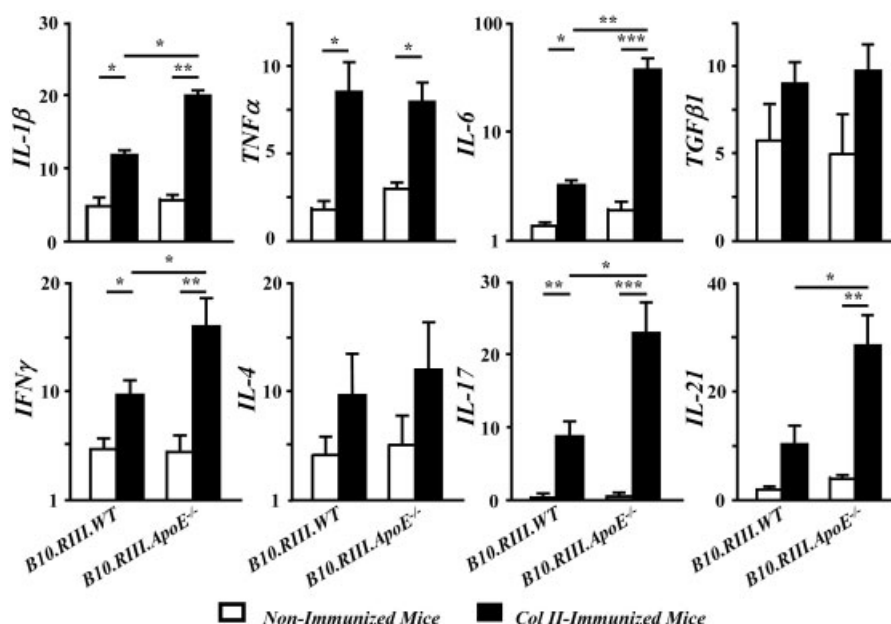


Figure 4. Increased expression of proinflammatory cytokines in the joints of B10.RIII apoE^{-/-} mice during development of CIA. Levels of mRNA for interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF α), IL-6, transforming growth factor β 1 (TGF β 1), interferon- γ (IFN γ), IL-4, IL-17, and IL-21 in the paws of nonimmunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice and B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA were analyzed by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Results are from 3 independent experiments. Values are the mean $\pm$ SD fold change in each cytokine level relative to GAPDH expression measured in parallel in each sample ($n = 15$ – 20 animals per group). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.005$. See Figure 2 for other definitions.

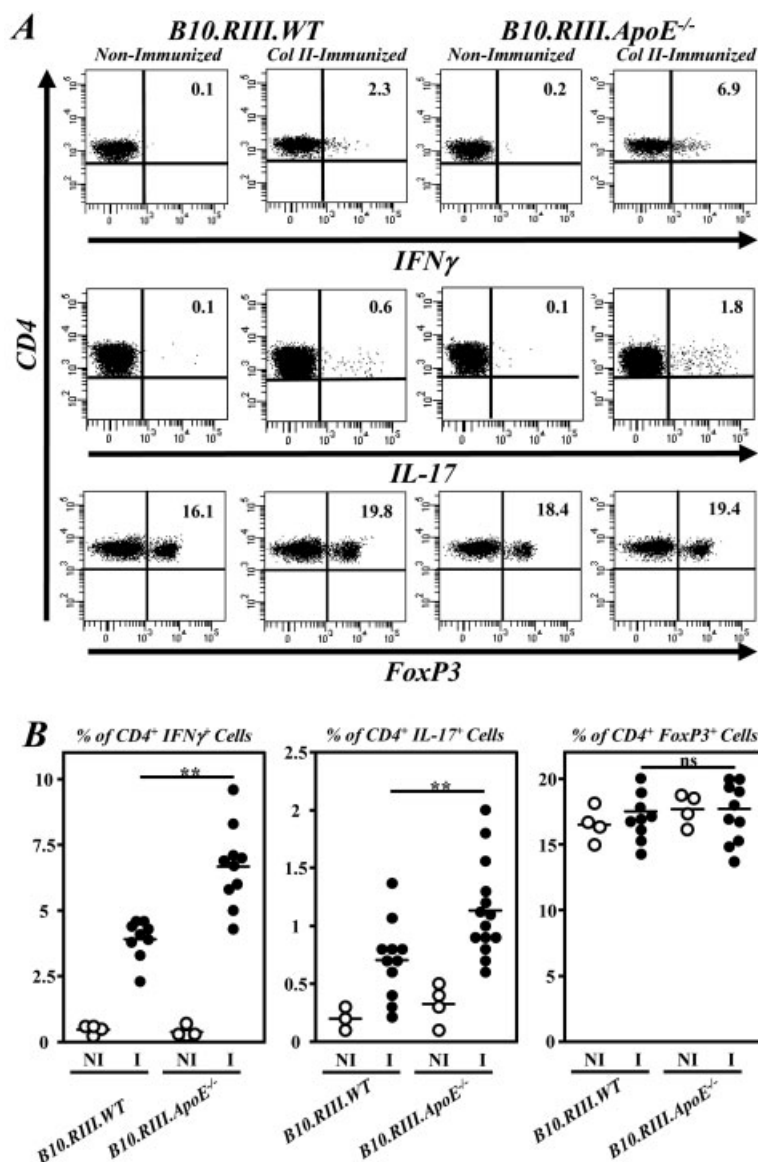


Figure 5. Expansion of Th1 and Th17, but not Treg, cells in the draining lymph nodes of CII-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice. Male B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (8–12 weeks old) were immunized with CII and CFA. For intracellular cytokine staining, lymphocytes from paraaortic lymph nodes were stimulated 3 weeks after immunization with phorbol myristate acetate and ionomycin in the presence of GolgiStop solution. **A**, Representative histograms of CD4+IFN γ + Th1, CD4+IL-17+ Th17, and CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells in the indicated groups, as determined by flow cytometry. Values are the percentage of cells. **B**, Percentages of CD4+IFN γ + Th1 (left), CD4+IL-17+ Th17 (middle), and CD4+CD25+FoxP3+ Treg (right) cells in nonimmunized mice (NI) and mice 3 weeks after immunization (I). No differences in the number of total lymph node cells were observed between nonimmunized and CII-immunized mice within each group (B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice). Circles represent individual mice; horizontal lines represent the mean. ** = $P < 0.01$. NS = not significant (see Figure 2 for other definitions).

with CII-CFA (Figure 4). In addition, levels of messenger RNA (mRNA) for IFN γ and IL-17, but not transforming growth factor β 1 (TGF β 1), IL-4, or IL-21, in the joint were augmented in B10.RIII wild-type mice with arthritis (Figure 4). In parallel with the aggravated CIA,

the expression of IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17, and IL-21 transcripts, but not TNF α , TGF β 1, or IL-4, in the joints of CII-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice was even higher than that found in B10.RIII wild-type mice that were developing CIA (Figure 4).

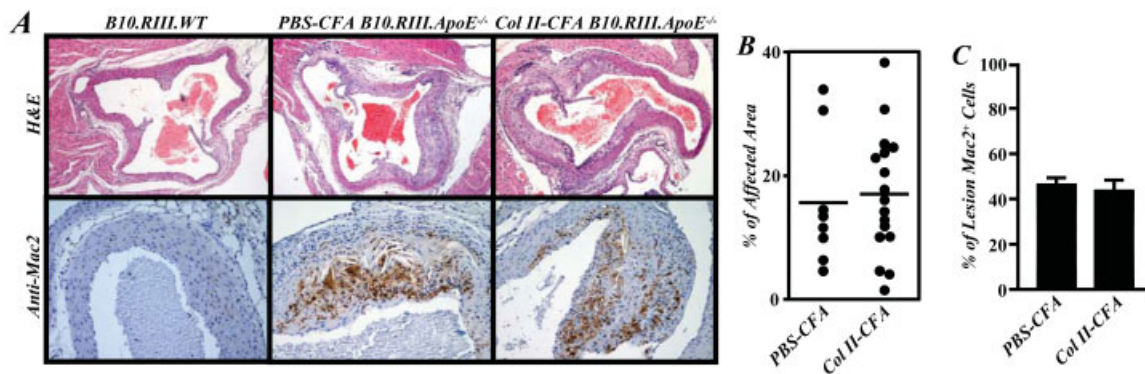


Figure 6. Lack of exacerbation of atherosclerosis by CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice. **A**, Representative histologic sections of the aortic sinus stained with hematoxylin and eosin (H&E), and of atherosclerotic lesions stained for the presence of Mac-2-immunoreactive macrophages, from age-matched untreated B10.RIII wild-type mice, B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with phosphate buffered saline (PBS) and CFA, and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII and CFA. Original magnification $\times 10$ in top panels and $\times 20$ in bottom panels. **B**, Percentage of area affected in the indicated group, as determined by computer-assisted morphometry. Results are from 2 independent experiments. Circles represent individual mice; horizontal lines show the mean. **C**, Percentage of macrophages in lesions, as determined by immunohistochemistry using an anti-Mac2 monoclonal antibody. Representative results of 2 independent experiments are shown. Values are the mean $\pm$ SD percentages of stained area relative to the area occupied by atheroma ($n = 5$ animals per group). See Figure 2 for other definitions.

Because of the pattern of cytokine expression in the joints and to further explore the mechanisms implicated in the worsening of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice, we compared the percentages of different functional CD4⁺ T cell subpopulations in the draining lymph nodes of B10.RIII wild-type mice with those in B10.RIII apoE^{-/-} mice before and after immunization with CII-CFA. Both IFN γ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cell populations were augmented in paraaortic lymph nodes from B10.RIII wild-type mice 3 weeks after immunization with CII-CFA (Figure 5). Again, this increase was significantly higher (~ 2 fold) in B10.RIII apoE^{-/-} mice (Figure 5). No differences in the percentage of Treg cells were observed between nonimmunized and immunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (Figure 5).

Lack of exacerbation of atherosclerosis in B10.RIII apoE^{-/-} mice developing CIA. We next investigated whether the development of severe CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice might in turn modify the clinical evolution of atherosclerosis in these mutant mice. Since adjuvants, including CFA, have potent atheromodulating capabilities in apoE^{-/-} mice (25), B10.RIII apoE^{-/-} mice injected in the base of the tail with only PBS emulsified in CFA were used as CIA-negative controls. As expected, these mice failed to develop arthritis (data not shown). Morphometric studies of the aortic sinus 8 weeks after immunization revealed that the extent of the

atherosclerotic area in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice was similar to that in PBS-CFA-treated B10.RIII apoE^{-/-} controls ($P > 0.6$) (Figures 6A and B). In addition, similar Mac-2-immunoreactive macrophage content was observed by immunohistochemistry in the atherosclerotic lesions of PBS-CFA-treated and CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice ($P > 0.5$) (Figures 6A and C).

DISCUSSION

In the present study, we explored the bidirectional relationship between RA and atherosclerosis development using an experimental mouse model. We demonstrated that deficiency in apoE and/or its consequences in cholesterol metabolism promote an accelerated and aggravated form of CIA in predisposed B10.RIII mice. The exacerbated CIA is accompanied by increased expression of multiple proinflammatory cytokines in the joints and by the expansion in the draining lymph nodes of Th1 and Th17 cell populations. However, the evolution of atherosclerosis in these B10.RIII apoE^{-/-} mice seems to be unchanged by the development of CIA. Our results clearly contrast with the findings of a recent study showing a resistance to CIA development in apoE-deficient mice (20). Although the reasons for these discrepancies are not clear, they may be related to the use of different CIA models that may

involve immunologic mechanisms that do not completely overlap. While H-2^f CIA-susceptible B10.RIII mice immunized with bovine CII were used in the present study, the previous study was performed with B6 (H-2^b) mice immunized with chicken CII, in which CIA develops with a lower incidence and severity (18,28).

Several mechanisms, which are not mutually exclusive, may explain the exacerbation of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice. ApoE-containing lipoproteins are very efficient at suppressing the mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes (29). In CD4⁺ and CD8⁺ T cells, this effect seems to be, at least in part, dependent on the decrease in the production of biologically active IL-2 (29). Furthermore, the intravenous administration of a small apoE mimetic peptide derived from the receptor binding region of the apoE holoprotein has been shown to suppress both systemic and brain inflammatory responses in mice after lipopolysaccharide administration (30). The antiinflammatory capacity of apoE appears to be isoform dependent, and in the above-mentioned experimental models of brain inflammation, animals expressing the E4 allele have greater inflammatory responses (30). Interestingly, there exists an association between the apoE4 genotype and bone loss in human RA (31). Thus, the enhanced CIA seen in B10.RIII apoE^{-/-} mice may be directly linked with the absence of the antiinflammatory properties of apoE.

On the other hand, apoE deficiency causes important changes in the serum lipid profile of B10.RIII apoE^{-/-} mice, with a notable inversion in the ratio of LDL cholesterol to HDL cholesterol in comparison to B10.RIII wild-type mice. These changes may be relevant for the induction of inflammatory responses, since the immunomodulatory action of HDL consists of inhibiting the expression of proinflammatory rather than antiinflammatory molecules (32) or protecting LDL against oxidation (8–11). In humans, oxidized LDL can be seen as an autoantigen inducing humoral immune responses that may induce cytokine production by macrophages through the activation of complement (33,34). The absence of apoE may also alter the protein composition of either the subclass of HDL with apoE or the entire fraction of serum HDLs, secondary to the induction of inflammatory responses, promoting the generation of HDLs with proinflammatory functions. In a previous study, the levels of proinflammatory HDLs with modified protein content were found to be increased in a cohort of patients with active RA (35). Experiments are in progress to explore such a possibility in B10.RIII apoE^{-/-} mice during CIA development.

The results of previous studies performed in animals that were immunologically depleted or geneti-

cally deficient in B cells underline the importance of humoral immune responses in the induction of CIA (36,37). Notably, B10.RIII apoE^{-/-} mice developing a more severe CIA than B10.RIII wild-type mice exhibited lower serum levels of IgG1, but not IgG2a, anti-CII antibodies. However, it should be stressed that not all antibodies produced in the course of an autoimmune reaction are necessarily pathogenic. In this regard, it has been demonstrated that the IgG2a switch variant of an anti-red blood cell autoantibody is ~20 times more pathogenic than the IgG1 switch variant (38), which is consistent with the different affinities of IgG2a and IgG1 antibodies for Fc γ receptors promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity (39). In addition, IgG2a antibodies activate the complement cascade much better than do IgG1 antibodies (40).

Independent of the pathogenicity of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies in CIA development, the reduction in the levels of circulating IgG1 anti-CII antibodies observed in B10.RIII apoE^{-/-} mice compared to B10.RIII wild-type mice indirectly reflects a distinct pattern of functional CD4 T cell differentiation in each strain of mice after CII immunization. The increased joint expression of the Th1 cytokine IFN γ and the Th17 cytokines IL-17 and IL-21, but not the Th2 cytokine IL-4 or the Treg cytokine TGF β 1, and the expansion of Th1 and Th17 cells, but not Treg cells, in the draining lymph nodes observed in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice confirm this assumption.

Whereas the pathogenic role of Th17 cells in the development of CIA has been clearly defined (15,16), the contribution of Th1 cells is less clear. Thus, IFN γ deficiency renders the normally resistant B6 strain susceptible to disease (41,42), and lack of IFN γ or signaling through the IFN γ receptor enhances the severity of arthritis in susceptible strains such as DBA/1 mice (43,44). On the other hand, enhanced Th1 and Th17 immune responses are observed in experimental situations associated with exacerbated CIA, such as in mice with a deficiency of myeloid cell-specific IL-1 receptor antagonist (45). Whether the increased joint expression of IFN γ and the expansion of Th1 cells in secondary lymphoid organs play a pathogenic or regulatory role in the development of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice remains to be determined.

One of the final consequences of the exacerbated CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice was the increase in the expression of multiple proinflammatory and arthritogenic cytokines, such as IL-1 β and IL-6, in the joint. However, despite the enhanced CIA observed in these animals, the expression of TNF α in the joints remained

similar to that in B10.RIII wild-type mice developing CIA. Although these results might appear to be paradoxical, a recent study showed that TNF blockade using TNFR-Fc fusion protein or anti-TNF mAb unexpectedly expanded the populations of Th1 and Th17 cells, which were shown by adoptive transfer to be pathogenic (46). Thus, an additional local increase in the expression of TNF α over the already excessive and pathogenic production of TNF α in RA (47) might play a regulatory role by limiting pathogenic CD4 $^{+}$ T cell responses. Alternatively, since TNF α expression can be regulated at multiple levels including via a posttranscriptional mechanism (48), it might be possible that the production and release of TNF α protein in B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice developing severe CIA was increased in the absence of an up-regulation of TNF α mRNA expression in the joints.

Unlike CIA, the severity of atherosclerosis is not affected by the development of arthritis in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice. Thus, the extent of vascular lesions in these CII-CFA-immunized mice is similar to that in PBS-CFA-immunized controls. In addition, similar levels of macrophages were observed in the atherosclerotic lesions of PBS-CFA-treated and CII-CFA-immunized B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice, indicating that the lack of enhanced vascular lesions in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice is not related to a preferential migration of inflammatory cells to the affected joints instead of the vessels.

However, it should be noted that adjuvants, including CFA, possess a potent atheroprotective capacity (25) that can mask the potential proatherogenic effect associated with the systemic inflammatory environment found in the animals developing arthritis. Consistent with this possibility and with the findings of previous studies (25), we have observed that the extent of atherosclerosis at the level of the aortic sinus in untreated B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice is significantly higher than that in B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice immunized with PBS-CFA, which fail to develop CIA (data not shown). This observation clearly indicates that an experimental model of RA requiring the use of CFA for its induction is not appropriate for studying the cellular and molecular mechanisms responsible for the accelerated atherosclerosis associated with this systemic autoimmune disease.

In conclusion, the results of the present study indicate that a metabolic abnormality associated with dyslipidemia (apoE deficiency) may influence the development of autoimmune diseases such as RA. These findings may be useful in the design of new therapeutic strategies in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Marcos López-Hoyos and Miguel Angel González-Gay (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain) and Dr. Jaime Calvo (Hospital Sierallana, Torrelavega, Spain) for helpful comments on the manuscript and Maria Aramburu, Natalia Cobo, and Iván Gómez for technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Ramón Merino had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Postigo, Rodríguez-Rey, J. Merino, R. Merino.

Acquisition of data. Postigo, Genre, Iglesias, Fernández-Rey, Buelta.

Analysis and interpretation of data. Postigo, Rodríguez-Rey, J. Merino, R. Merino.

REFERENCES

1. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:8–17.
2. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:350–7.
3. Del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44:2737–45.
4. Choi HK, Seeger JD. Lipid profiles among US elderly with untreated rheumatoid arthritis—the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Rheumatol* 2005;32:2311–6.
5. Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH, Lee CW, Lee CH, et al. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:1701–4.
6. Yoo WH. Dyslipoproteinemia in patients with active rheumatoid arthritis: effects of disease activity, sex, and menopausal status on lipid profiles. *J Rheumatol* 2004;31:1746–53.
7. Van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, et al. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:184–8.
8. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622–30.
9. Hui DY, Harmony JAK, Innerarity TL, Mahley RW. Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apoprotein E and apoprotein B. *J Biol Chem* 1980;255:11775–81.
10. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000;41:1481–94.
11. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000;41:1495–508.
12. Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 2002;323:3–10.
13. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001;6:D515–25.
14. Gustafsson K, Karlsson M, Andersson L, Holmdahl R. Structures

- on the I-A molecule predisposing for susceptibility to type II collagen-induced autoimmune arthritis. *Eur J Immunol* 1990;20:2127–31.
15. Xie JJ, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yuan J, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(–/–) mice. *Cytokine* 2010;49:185–93.
 16. Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, et al. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2010;121:1746–55.
 17. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersseelaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004;50:650–9.
 18. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673–82.
 19. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010;140:845–58.
 20. Asquith DL, Miller AM, Hueber AJ, Liew FY, Sattar N, McInnes IB. Apolipoprotein E-deficient mice are resistant to the development of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:472–7.
 21. Gonzalez J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, Gonzalez-Gay MA, et al. CD4⁺CD25⁺ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol* 2007;178:2778–86.
 22. Sancho D, Gomez M, Viedma F, Esplugues E, Gordon-Alonso M, Garcia-Lopez MA, et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 2003;112:872–82.
 23. Lopez-Hoyos M, Marquina R, Tamayo E, Gonzalez-Rojas J, Izui S, Merino R, et al. Defects in the regulation of B cell apoptosis are required for the production of citrullinated peptide autoantibodies in mice. *Arthritis Rheum* 2003;48:2353–61.
 24. Marquina R, Diez MA, Lopez-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand white $\times$ C57BL/6)F(1)-bcl-2 transgenic mice. *J Immunol* 2004;172:7177–85.
 25. Khallou-Laschet J, Tupin E, Caligiuri G, Poirier B, Thiebtemont N, Gaston AT, et al. Atheroprotective effect of adjuvants in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 2006;184:330–41.
 26. Gonzalez-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinue A, Andres-Manzano MJ, Collado M, Serrano M, et al. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2258–68.
 27. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007;7:65–70.
 28. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2^b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000;30:1568–75.
 29. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li H-M, Harmony JAK. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol* 1994;159:124–39.
 30. Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, et al. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem* 2003;278:48529–33.
 31. Lee SI, Lee SY, Yoo WH. Association of apolipoprotein E polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1067–8.
 32. Gruaz L, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Dayer JM, Burger D. Blockade of T cell contact-activation of human monocytes by high-density lipoproteins reveals a new pattern of cytokine and inflammatory genes. *PLoS ONE* 2010;5:e9418.
 33. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res* 2006;47:1975–83.
 34. Lopes-Virella MF, Virella G. Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol* 2010;134:55–65.
 35. Charles-Schoeman C, Watanabe J, Lee YY, Furst DE, Amjadi S, Elashoff D, et al. Abnormal function of high-density lipoprotein is associated with poor disease control and an altered protein cargo in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2870–9.
 36. Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, Steeber DA, St Clair EW, Tedder TF. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 2007;179:1369–80.
 37. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1998;111:521–6.
 38. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, Chicheportiche Y, Watanabe N, Saito T, et al. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fc γ receptor III. *J Exp Med* 2000;191:1293–302.
 39. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275–90.
 40. Neuberger MS, Rajewsky K. Activation mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* 1981;11:1012–16.
 41. Chu CQ, Song Z, Mayton L, Wu B, Wooley PH. IFN γ deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 2003;62:983–90.
 42. Guedez YB, Whittington KB, Clayton JL, Joosten LA, van de Loo FA, van den Berg WB, et al. Genetic ablation of interferon- γ up-regulates interleukin-1 β expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum* 2001;44:2413–24.
 43. Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, Abehsira-Amar O, Batteux F, Muller S, et al. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- γ receptors. *J Immunol* 1997;158:5501–6.
 44. Vermeire K, Heremans H, van de Putte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN- γ receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:5507–13.
 45. Lamacchia C, Palmer G, Seemayer CA, Talbot-Ayer D, Gabay C. Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2010;62:452–62.
 46. Notley CA, Inglis JJ, Alzabin S, McCann FE, McNamee KE, Williams RO. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 2008;205:2491–7.
 47. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Treatment with a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor α suppresses disease activity in rheumatoid arthritis: results of a multi-centre, randomised, double blind trial. *Lancet* 1994;344:1105–10.
 48. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK III. Biology of tumor necrosis factor- α -implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 2004;13:193–222.

Anexo II:

***Otros trabajos
publicados durante el
período predoctoral***



B-cell overexpression of Bcl-2 cooperates with p21 deficiency for the induction of autoimmunity and lymphomas

Inés Santiuste^a, Luis Buelta^b, Marcos Iglesias^{a,c}, Fernanda Genre^{a,c}, Francisco Mazorra^d, Shozo Izui^e, Jesús Merino^a, Ramón Merino^{a,c,*}

^a Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria-Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

^b Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Cantabria, Santander Spain

^c Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria/CSIC-Universidad de Cantabria-IDICAN, Santander Spain

^d Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

^e Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2010

Received in revised form

8 July 2010

Accepted 9 July 2010

Keywords:

Systemic lupus erythematosus

B-cell lymphomas

p21^{WAF1/Cip1}

p27^{kip1}

Bcl-2

ABSTRACT

Genetic abnormalities predisposing to autoimmunity generally act in a cooperative manner affecting one or several mechanisms regulating immunological tolerance. In addition, many of these genetic abnormalities are also involved in the development of lymphoproliferative diseases. In the present study, we have determined the possible cooperation between deficiencies in members of the Cip/Kip family of cell cycle regulators (p21^{WAF1/Cip1} or p27^{kip1}) and the overexpression of human Bcl-2 in B lymphocytes in the induction of autoimmune and lymphoproliferative diseases in non-autoimmune C57BL/6 (B6) mice. Unlike single mutant mice, B6.p21^{-/-} mice transgenic for human Bcl-2 in B cells developed a lethal autoimmune syndrome characterized by the production of autoantibodies, the prominent expansion of memory B and CD4⁺ T cells and the development of severe glomerular lesions resembling IgA nephropathy. Furthermore, these mice presented a high incidence of B-cell lymphoproliferative disorders. Such genetic cooperation in the induction of autoimmunity was not observed in B6.p27^{-/-} mice transgenic for human Bcl-2 in B cells. Altogether, what we have demonstrated here is the existence of preferential interactions among particular regulators of the G₁/S transition of the cell cycle and B-cell survival in the induction of systemic autoimmune and lymphoproliferative diseases.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

With rare exceptions, the development of autoimmune diseases requires the contribution of multiple genetic, epigenetic and environmental factors. These factors generally act in a cooperative manner affecting one or several mechanisms that regulate the induction and maintenance of immunological tolerance [1]. Among the best characterized genetic alterations involved in the

development of autoimmunity, are those that affect the regulation of lymphocyte survival. Using a line of transgenic (Tg) mice overexpressing human Bcl-2 (hBcl-2) in B lymphocytes, we and others have demonstrated that Tg mice bearing a pro-autoimmune genetic background develop a lethal autoimmune lupus-like syndrome that is dependent on the activity of CD4⁺ lymphocytes [2,3]. However, the overexpression of hBcl-2 in B cells from C57BL/6 (B6) mice, which do not have a genetic predisposition to developing the disease, fails to promote autoimmune manifestations [2], indicating that the inhibition of B lymphocyte apoptosis by itself is not sufficient to trigger a severe autoimmune reaction. Similarly, B6 mice deficient in *bim* or *Fas* fail to develop a fatal autoimmune pathology in contrast to the severe systemic lupus erythematosus (SLE) observed in mixed (129/Sv × B6)-*bim*^{-/-} or MRL.*Fas*^{lpr} mice, respectively [4–6].

The deregulation in the control of lymphocyte proliferation is also associated with the development of autoimmune diseases. In this sense, mice deficient in p21^{WAF1/Cip1} (p21; a member of the Cip/Kip family of cell cycle inhibitors) in a line of mice with a mixed (129/Sv × B6) genetic background (derived from 2–3 intercrosses)

Abbreviations: Transgenic mice, Tg; human Bcl-2, hBcl-2; systemic lupus erythematosus, SLE; C57BL/6, B6; p21^{WAF1/Cip1}, p21; p27^{kip1}, p27; autoantibodies, autoAbs; lymphoproliferative disorders, LPD; B6-SV40-Eμ-hbcl-2-22 Tg mice, B6-hBcl-2-B Tg; B6.129S2-Cdkn1a^{tm1Tyj/J}, B6.p21^{-/-}; B6.129S4-Cdkn1b^{tm1Mif/J}, B6.p27^{-/-}; carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE; bromodeoxyuridine, BrdU; gp70 anti-gp70 immune complexes, gp70 IC; wild type, wt; polymorphic LPD, PLPD; activation-induced cell death, AICD.

* Corresponding author at: IBBTEC, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. Tel.: +34 942 201956; fax: +34 942 201945.

E-mail address: merinor@unican.es (R. Merino).

develop a fatal lupus-like syndrome that affects females more than males [7]. Similarly, the administration of a peptidyl mimic of p21 into (NZB $\times$ NZW) F_1 females significantly reduces the severity of the spontaneous SLE in these animals [8]. Again, the severity of the autoimmune syndrome in p21 $^{-/-}$ mice appears to be modulated by the genetic background of the mice analyzed. Thus, B6 and BXSb mice deficient in p21 or an additional line of p21 $^{-/-}$ mixed (129/Sv $\times$ B6) mice, derived from an unknown number of intercrosses, are largely protected from the development of SLE [9–12]. Another member of the Cip/Kip family acting as a negative regulator of cell cycle is p27^{kip1} (p27). Studies have shown that p27 plays an important role in the induction and maintenance of clonal anergy of T lymphocytes induced after inhibition of co-stimulation [13]. In anergic CD4 $^{+}$ T lymphocytes, p27 inhibits the phosphorylation of Smad-3 resulting in an increase of the inhibitor of Cdk, p15. Consequently, the deficiency in p27 prevents the induction of clonal anergy in T lymphocytes [14]. However, p27 $^{-/-}$ mice do not develop evident autoimmune manifestations [15].

In addition to their ability to promote autoimmunity in the context of a particular genetic predisposition, the cell cycle and apoptotic regulators mentioned above may be also involved in tumor development. In this regard, Bcl-2 was initially identified as a gene implicated in the t(14;18) chromosomal translocation found in the majority of follicular B-cell lymphomas [16] and Tg mice overexpressing Bcl-2 in B cells spontaneously developed plasmacytomas or immunoblastic B-cell lymphomas albeit with a low incidence [17,18]. Similarly, an association between Burkitt's lymphomas and mutations in p21 that diminish the functional activity of this cell cycle regulator has been reported in humans [19], and p21 $^{-/-}$ mice have a higher incidence of different types of tumours, including B-cell lymphomas, in aged but not young mice [20]. More recently, it has been shown that p27 $^{-/-}$ mice overexpressing Bcl-2 in T lymphocytes spontaneously develop T-cell lymphomas with a high incidence [21].

Based on these findings, in the present study we have determined the possible cooperation between p21 or p27 deficiency and the B-cell overexpression of Bcl-2 in the development of both lupus-like autoimmune disease and B-cell malignancies in normal B6 mice. Our results show that B6.p21 $^{-/-}$ mice transgenic for hBcl-2 in B cells (B6.p21 $^{-/-}$ -hBcl-2-B Tg) developed a lethal lupus-like syndrome characterized by the production of autoantibodies (autoAbs), the increase in memory B and CD4 $^{+}$ T cells and the presence of severe glomerular lesions resembling an IgA nephropathy. In addition, these mice exhibited a high incidence of B-cell lymphoproliferative disorders (LPD). On the other hand, the deficiency in p27 failed to promote autoimmune responses in B6.hBcl-2-B Tg mice, indicating the existence of preferential interactions among particular regulators of the G₁/S transition of the cell cycle and cell survival for the control of B-cell tolerance.

2. Materials and methods

2.1. Mice

B6 mice were obtained from Harlan Iberica (Barcelona, Spain). B6-SV40-E μ -hBcl-2-22 Tg mice (B6-hBcl-2-B Tg) [3] overexpressing hBcl-2 in B cells, B6.129S2-Cdkn1a^{tm1Tyj}/J (B6.p21 $^{-/-}$) [22] and B6.129S4-Cdkn1b^{tm1Mlf}/J (B6.p27 $^{-/-}$) mice [15] were purchased from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). The selection of hBcl-2-B Tg mice was performed by flow cytometry using peripheral blood mononuclear cells and a specific mAb against hBcl-2 (clone 6C8; BD Biosciences, Madrid, Spain), as described previously [23]. B6.p21 $^{-/-}$ -hBcl-2-B Tg and B6.p27 $^{-/-}$ -hBcl-2-B Tg mice were obtained by intercrossing F1 progeny of B6.p21 $^{-/-}$ and B6.p27 $^{-/-}$ mice with B6-hBcl-2-B Tg mice. The p21 and p27 genotyping of the

different strains of mice was performed by PCR. Male and female mice of each mouse strain were analyzed together. The mice were bled every two months from the retro-orbital plexus, and the resulting sera were stored at -20°C until used.

All studies with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee.

2.2. Cell death and *in vitro* proliferation assays

To analyze the possible modulation of hBcl-2 anti-apoptotic activity in B cells by p21 or p27 deficiency *in vivo*, 2 month-old mice of the different strains used here were injected ip. with 2 mg of dexamethasone sodium phosphate (American Regent Laboratories, Shirley, NY). The numbers of pre-B (B220^{low}IgM $^{-}$) and immature B (B220^{low}IgM $^{+}$) cells in the bone marrow were analyzed 48 h later by flow cytometry.

Purified B cells (more than 95% purity in all cases) from different strains of mice were obtained from the spleen after *in vitro* treatment with anti-Thy-1.2 mAb (clone AT-83, a rat IgM anti-mouse Thy-1.2 mAb) and complement (Cedarlane Laboratories, Hornby, ON, Canada). The effects of hBcl-2 overexpression on B cell survival *in vitro* in the different lines of hBcl-2 Tg mice and non-Tg controls were assessed using purified cell populations cultured with RPMI medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10^{-5} M 2-mercaptoethanol and 10% heat-inactivated FCS (Hyclone Laboratories, Logan, UT), as described previously [24].

B-cell labelling with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) was performed according to the manufacturer's instructions. For *in vitro* proliferation assays, 2×10^5 CFSE-labelled B cells from the different strains of mice were stimulated during 48 h with LPS or an affinity-purified F(ab')₂ goat anti-mouse IgM polyclonal Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), at concentrations of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cell division was analyzed by flow cytometry according to the CFSE intensity dilution.

2.3. Flow cytometry studies

The number of total B220, B220⁺IgM $^{-}$ IgD $^{-}$ CD138 $^{-}$ (memory phenotype), naïve CD4 $^{+}$ CD44^{low}CD62L^{high}, CD4 $^{+}$ CD44^{high}CD62L^{low} (memory phenotype), naïve CD8 $^{+}$ CD44^{low}CD62L^{high} and CD8 $^{+}$ CD44^{high}CD62L^{low} (memory phenotype) cells in the spleen of the different strains of mice was evaluated by flow cytometry at 2 and 8 months of age. Single cell suspensions were stained with different combinations of fluorescein isothiocyanate-, phycoerythrin-, peridinin chlorophyll protein- and biotin-conjugated mAbs (BD Biosciences) followed by allophycocyanin-conjugated streptavidin. A total of 5×10^4 viable cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

2.4. Serological studies

Serum levels of total IgA and IgG were determined by ELISA as described previously [2,25]. Results were expressed in mg/ml in reference to a standard curve obtained with a mouse reference serum (ICN Biomedicals Inc.). The presence of IgG and IgA anti-DNA autoAbs was determined in sera by ELISA as described [2,25] and the results expressed in TU in reference to a standard curve obtained from a serum pool from 6 to 8 months old MRL *lpr/lpr* mice. Serum levels of IgG gp70 anti-gp70 immune complexes (gp70 IC) were quantified by ELISA [26] and the results expressed as μg of Ab-bound gp70/ml of serum.

2.5. Histopathology

Samples of all major organs were obtained at autopsy. Organs were included in paraffin and stained with hematoxylin-eosin or Masson trichrome for pathological studies. Glomerulonephritis was scored on a 0–4 scale as previously described [27]. Grades 3 and 4 glomerulonephritis were considered significant contributors to clinical disease and/or death. The incidence of B-cell LPD in the different mouse strains was analyzed at 8–10 and 18 months of age by histology, immunohistochemistry and flow cytometry. All histological preparations were analyzed blinded by one (kidney sections) or two (B-cell LPD) pathologists.

Tissue-bound IgG and IgA antibodies were studied by immunofluorescence on kidney cryosections using FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch) or FITC-conjugated goat anti-mouse IgA antibody (Cappel Laboratories, Cochranville, PA).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of differences between groups of mice was performed using the Mann–Whitney test. Probability values <0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Lack of the effect of p21 deficiency on the survival and proliferation of B cells overexpressing hBcl-2

We first determined whether p21 deficiency modulated the anti-apoptotic activity of hBcl-2 in B cells from B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B

Tg mice, as p21 can act as a survival factor in several cell types including T lymphocytes [reviewed in 28]. After the viability of purified B cells in culture had been assessed during a period of 10 days, B cells from both B6.hBcl-2-B Tg and B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice exhibited a similarly improved survival as compared to B cells from B6-wt and B6.p21^{-/-} mice (Fig. 1A). The lack of the effect of p21 deficiency on B-cell survival was confirmed *in vivo* after induction of apoptosis of pre-B and immature B cells with glucocorticoids. The injection of dexamethasone into B6-wt and B6.p21^{-/-} mice induced the elimination of about 85% of B220^{low}-IgM⁻ pre-B and 80% B220^{low}-IgM⁺ immature B cells in the bone marrow (Fig. 1B). These two B-cell precursors were, however, largely preserved in dexamethasone-treated B6.hBcl-2-B Tg mice and this protection was not modified in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (Fig. 1B).

It has been reported that the overexpression of Bcl-2 has an anti-proliferative effect in lymphocytes [29,30]. Accordingly, the *in vitro* proliferation of B lymphocytes from B6.hBcl-2-B Tg mice 48 h after stimulation with anti-IgM antibodies or LPS was lower than that observed with B cells from B6-wt mice (Fig. 1C). Although an increased *in vitro* anti-IgM- or LPS-induced B-cell proliferation was observed in B6.p21^{-/-} mice, the p21 deficiency was not sufficient to rescue the proliferative defect induced by Bcl-2 overexpression in B cells from B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (Fig. 1C).

3.2. Effects of B-cell overexpression of hBcl-2 in p21^{-/-} mice in the development of autoimmunity

We next compared the development of a lupus-like autoimmune disease between B6-wt, B6.p21^{-/-}, B6.hBcl-2-B Tg and

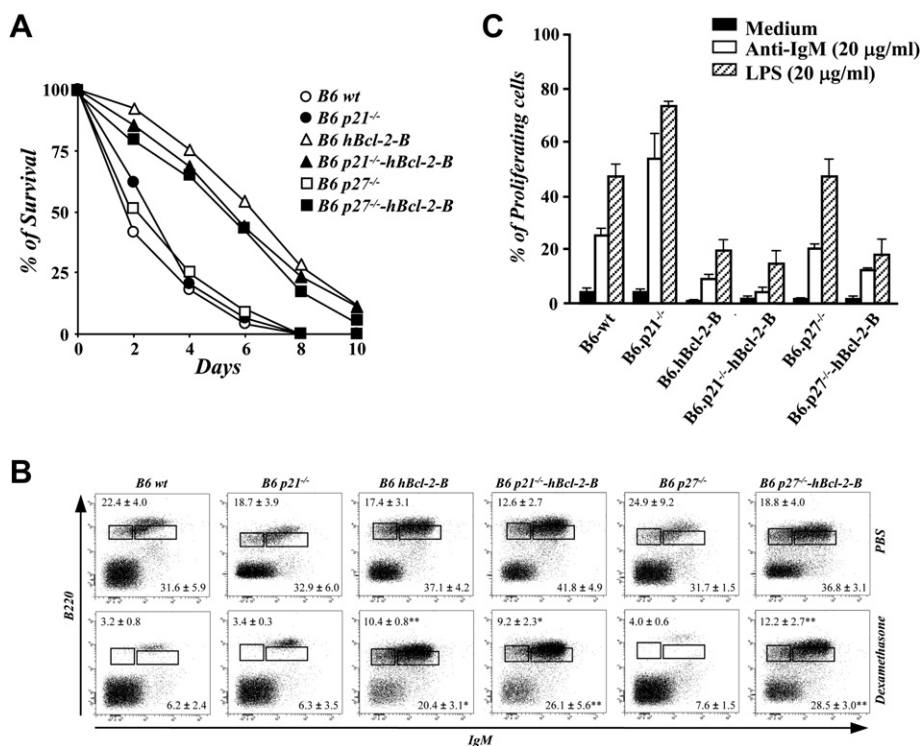


Fig. 1. Survival and proliferation of B cells from B6 mice overexpressing hBcl-2 in B cells and deficient in p21 or p27. **A**) Purified B cells from different strains of mice were cultured in triplicates in 96-well flat-bottomed plates at a concentration of 10^6 cells/ml in RPMI 10% FCS. From day 1–10, viability of spleen B cells was assessed by trypan blue exclusion. Results are representative of two separate experiments. **B**) 2 month-old mice were injected ip with PBS (upper panels) or 2 mg of dexamethasone (lower panels). The elimination of B220^{low}-IgM⁻ pre-B and B220^{low}-IgM⁺ immature B cells was evaluated by flow cytometry 48 h after treatment. The mean $\pm$ SD of the percentages of B220^{low}-IgM⁻ pre-B (upper left) and B220^{low}-IgM⁺ immature B cells (bottom right) in the different experimental groups (3 mice/group) are indicated in each panel. Statistic differences between hBcl-2 Tg and non-Tg dexamethasone-treated animals are indicated as follow: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$. Results are representative of three separate experiments. **C**) CFSE-labelled B cells (2×10^5) from the different strains of mice were stimulated during 48 h with 20 µg/ml LPS or 20 µg/ml of anti-IgM antibody. Cell division was analyzed by flow cytometry according to the CFSE intensity dilution. Results, representative of two separate experiments, are expressed as the mean percentage $\pm$ SD (3 mice/group) of proliferating cells.

B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice by analyzing the levels of circulating autoAbs at 6 months of age. A significant increase in serum levels of IgA and IgG anti-ssDNA autoAbs was observed in B6.hBcl-2-B Tg mice in comparison to B6-wt and B6.p21^{-/-} mice ($p < 0.01$ in all cases), while levels of nephritogenic gp70 IC were essentially identical in these three strains of mice (Fig. 2A). In contrast, B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice exhibited 2–4-fold higher levels of anti-ssDNA and gp70 IC than B6.hBcl-2-B Tg mice (Fig. 2A; $p < 0.005$ in all the cases). In addition, analysis of serum levels of IgA and IgG also revealed significant increases of IgA in B6.hBcl-2-B Tg mice, as compared with B6-wt and B6.p21^{-/-} mice ($p < 0.01$), and of both IgA and IgG in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice, as compared with B6.hBcl-2-B Tg mice ($p < 0.005$), (Fig. 2B).

We compared by flow cytometry the distribution of B and T cell populations in spleens between B6-wt, B6.p21^{-/-}, B6.hBcl-2-B Tg and B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice at 2 and 8 months of age. As expected, mice overexpressing hBcl-2 in B cells displayed a marked accumulation of B cells in B6.hBcl-2-B and B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (Table 1). The size of B cells with a memory phenotype (B200⁺IgM⁻IgD⁻CD138⁻) was greatly enlarged in 2 and 8 month-old B6.hBcl-2-B Tg mice ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) and modestly increased in B6.p21^{-/-} mice at 8 months of age ($p < 0.05$; Table 1). The combination of Bcl-2 overexpression

and p21 deficiency appeared synergistic as the number of B200⁺IgM⁻IgD⁻CD138⁻ B cells in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice was highly increased ($p < 0.05$ at 2 months and $p < 0.001$ at 8 months; Table 1). As reported in mixed (129/Sv $\times$ B6) mice deficient in p21 [7], an age-dependent expansion in CD4⁺ T cells with a memory phenotype (CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low}) was observed in B6.p21^{-/-} mice ($p < 0.05$; Table 1). Such an expansion was more pronounced in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice ($p < 0.005$) and already evident at 2 months of age, which was not the case in B6.hBcl-2-B Tg mice (Table 1). No differences were observed in the numbers of naïve and memory CD8⁺ T cells among these strains of mice.

In correlation with the production of autoAb and the expansion of B200⁺IgM⁻IgD⁻CD138⁻ B and CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} T cells, B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice had a reduced lifespan in comparison to B6-wt, B6.p21^{-/-} and B6.hBcl-2-B Tg mice (Fig. 3). In fact, 50% of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice died at around 16 months of age ($p < 0.001$). When examined for the cause of death, 52% (22/42) of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice ($p < 0.001$) showed at the time of autopsy a severe glomerulonephritis (Fig. 4A) characterized by an intense mesangial matrix expansion, secondary to collagen accumulation (stained in blue with the Masson trichrome) that completely collapsed the capillary spaces (glomerulosclerosis) (Fig. 4B). By direct immunofluorescence, prominent deposits of IgA,

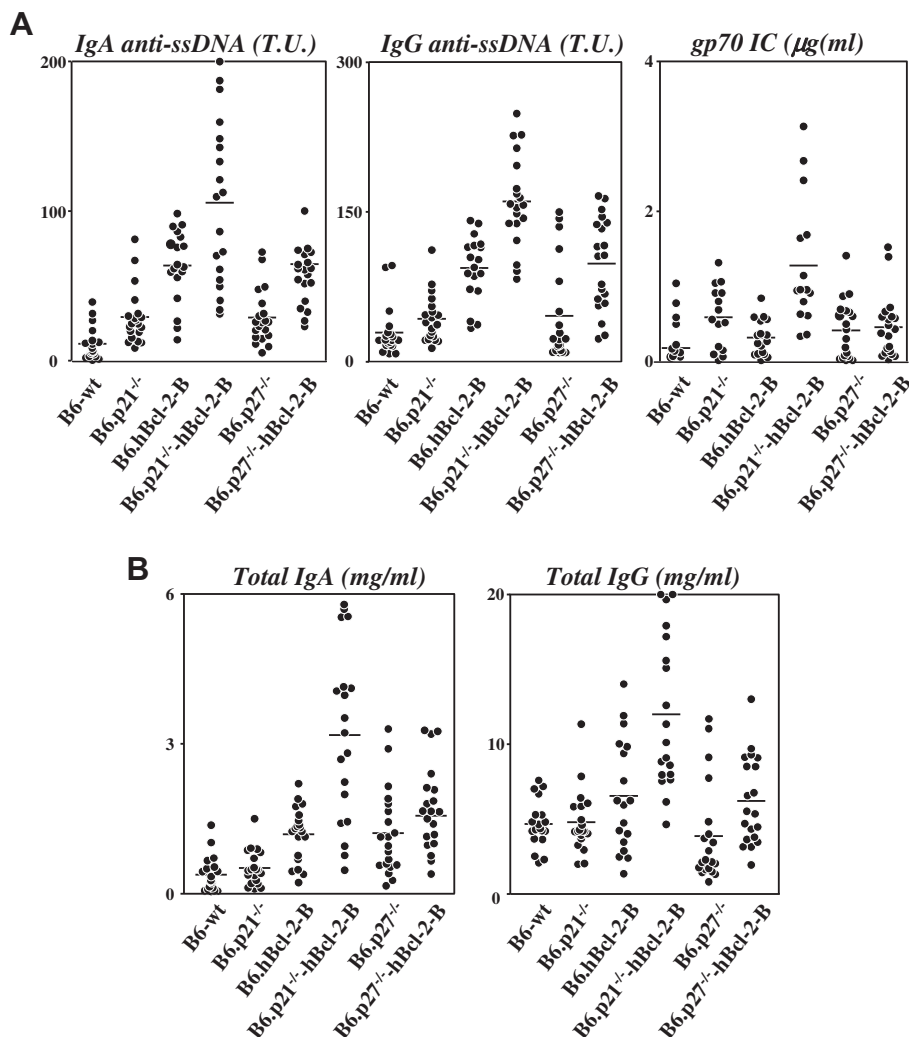


Fig. 2. Production of autoAbs in B6 mice overexpressing hBcl-2 in B cells and deficient in p21 or p27. A and B) Serum levels of IgA and IgG anti-DNA autoAbs and gp70 IC (A) and of total IgA and IgG (B) in the mentioned mouse strains at 6 months of age. Values of individual mice are expressed. Bars represent the mean value of each examination.

Table 1Distribution of naïve and memory B and CD4⁺ T cell populations in p21 and p27 deficient mice in the context of hBcl-2 B-cell overexpression.

Mice	Age	B Cells		CD4 ⁺ Cells		CD8 ⁺ Cells	
		B220 ⁺	Memory	Naïve	Memory	Naïve	Memory
B6-wt	2	36.4 ± 8.9	2.3 ± 0.5	10.8 ± 4.9	5.3 ± 1.1	7.9 ± 3.2	1.8 ± 0.3
	8	57.1 ± 10.5	4.9 ± 2.4	11.9 ± 5.3	8.1 ± 1.5	11.6 ± 5.9	2.1 ± 1.8
B6.p21 ^{-/-}	2	44.1 ± 17.1	3.9 ± 1.9	11.3 ± 4.8	8.3 ± 4.1	7.9 ± 3.1	1.9 ± 1.5
	8	35.6 ± 15.4	7.1 ± 3.1	6.4 ± 2.8	14.1 ± 3.9	6.4 ± 2.7	2.2 ± 1.0
B6.hBcl-2-B Tg	2	166.8 ± 56.5	16.8 ± 6.8	14.1 ± 3.2	6.5 ± 1.0	13.1 ± 3.2	2.1 ± 0.9
	8	138.8 ± 66.2	22.8 ± 8.4	14.8 ± 5.4	10.1 ± 3.7	14.5 ± 6.3	2.8 ± 1.8
B6.p21 ^{-/-} -hBcl-2-B Tg	2	206.4 ± 42.8	31.1 ± 9.3	12.2 ± 5.6	15.1 ± 7.7	11.1 ± 3.3	3.9 ± 1.1
	8	220.6 ± 38.5	41.5 ± 10.1	7.6 ± 3.7	22.5 ± 7.8	7.8 ± 4.2	3.4 ± 1.4
B6.p27 ^{-/-}	2	66.2 ± 12.9	4.4 ± 2.2	19.9 ± 8.2	18.1 ± 8.2	23.1 ± 7.1	5.9 ± 3.4
	8	104.5 ± 39.3	17.3 ± 6.1	7.2 ± 3.4	18.4 ± 5.7	8.3 ± 3.7	5.4 ± 2.3
B6.p27 ^{-/-} -hBcl-2-B Tg	2	137.7 ± 50.1	16.4 ± 7.5	23.4 ± 4.6	21.9 ± 8.1	28.4 ± 6.3	6.2 ± 1.8
	8	116.6 ± 32.8	29.2 ± 7.1	5.1 ± 2.7	23.8 ± 8.9	6.0 ± 2.3	6.7 ± 2.7

Total B220⁺, B200⁺IgM⁻IgD⁻CD38⁻ memory, CD4⁺CD44^{low}CD62L^{high} naïve, CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} memory, CD8⁺CD44^{low}CD62L^{high} naïve and CD8⁺CD44^{high}CD62L^{low} memory cells were evaluated in the spleen of 2 and 8 month-old mice by flow cytometry. Results from 6 to 8 mice/group are expressed as the mean ± SD of the number of cells of each population.

but not of IgG, were detected in the glomerular mesangium of these animals (Fig. 4B). None of the B6-wt, B6.p21^{-/-} and B6.hBcl-2-B Tg mice examined showed severe glomerular lesions at 14–16 months of age (Fig. 4A and B). Altogether, our results indicated the development of an IgA nephropathy associated to SLE in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice. Unlike mice deficient in p21 in a mixed (129/Sv × B6) genetic background which developed a lupus-like syndrome that affects females more than males [7], no differences in the levels of circulating autoAbs, memory B and CD4⁺ T cell expansion, development of glomerulonephritis and mortality rate were observed between both sexes of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (data not shown).

3.3. Absence of a severe SLE in B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice

We further explored whether the deficiency of p27, another regulator of the G₁/S transition of cell cycle, also cooperates with hBcl-2 overexpression in B cells for the induction of autoimmunity mice. As observed in p21^{-/-} mice, the deficiency in p27 failed to modify the survival of B cells and the anti-apoptotic activity of Bcl-2 *in vitro* and *in vivo* (Fig. 1A and B). In addition, the analysis for the effects of p27 deficiency in the proliferation of hBcl-2 overexpressing B cells showed that the reduced proliferation of B cells in mice overexpressing hBcl-2 was not restored by p27 deficiency (Fig. 1C).

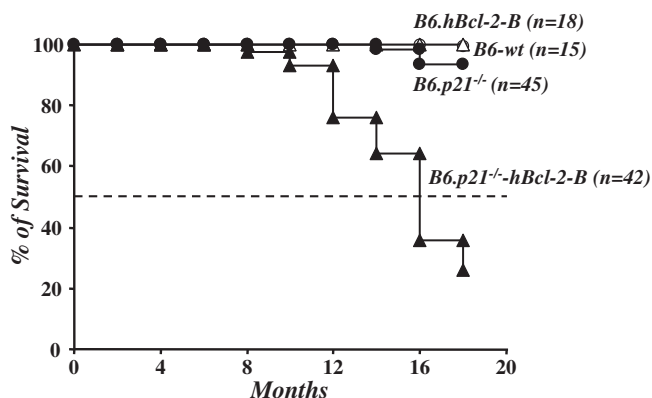
When the production of autoAbs in B6.p27^{-/-} mice at 6 months of age was analyzed, only the levels of circulating total IgA and IgG were slightly increased or reduced, respectively, in

comparison to B6-wt and B6.p21^{-/-} mice (Fig. 2; $p < 0.02$ in all cases). The levels of circulating IgA and IgG anti-ssDNA autoAbs in B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice were significantly elevated as compared to B6.p27^{-/-} mice ($p < 0.005$ in all cases), but not higher than those of B6.hBcl-2-B Tg mice and much lower than those of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (Fig. 2; $p < 0.002$ in all cases). The pool of B200⁺IgM⁻IgD⁻CD138⁻ B cells was increased in the spleen of 8 month-old B6.p27^{-/-} and 2 and 8 month-old B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice in comparison to B6-wt mice, but was still lower than that of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice at both 2 and 8 months of age (Table 1; $p < 0.01$ in both cases). Furthermore, B6.p27^{-/-} and B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice also displayed an increase in the number of CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} T cells at levels similar to that observed in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (Table 1). The analysis of renal histopathology at 14 months of age in B6.p27^{-/-} and B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice revealed that only 13% of B6.p27^{-/-} (3/22) and B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (3/23) developed a severe glomerulonephritis (Fig. 4A and C).

3.4. Development of B-cell LPD in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice

Since almost half of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice did not show severe glomerular lesions at the time of autopsy, we explored for the presence of additional causes of death in these animals. In fact, B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice presented an elevated incidence of B-cell LPD, evaluated by histological analysis (Fig. 5 and Table 2) and immunohistochemistry and/or flow cytometry (data not shown). These malignancies were classified into two histological categories; polymorphic LPD (PLPD) composed of B cells at different stages of development/activation (small cells, immunoblasts and plasma cells) (Fig. 5A and B) and monomorphic LPD resembling immunoblastic B-cell lymphomas (Fig. 5C and D) showing signs of high proliferative activity such as abundant aberrant mitosis (Figure C) and a starry sky pattern (Fig. 5D), indicative of the presence of macrophages phagocytosing dying cells. These lymphomas usually formed solid peritoneal tumours and infiltrated other organs such as the liver or kidneys (Fig. 5D). Some animals displayed only PLPD but the majority of mice with B-cell lymphomas also had PLPD usually in the infiltrating organs (Fig. 5D and E).

To analyze in greater detail the development of LPD in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice in comparison to B6-wt, B6.p21^{-/-} and B6.hBcl-2-B Tg mice, groups of these animals were sacrificed at 8–10 months and 18 months of age. At 8–10 months of age 31% and 44% of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice presented PLPD and B-cell lymphomas, respectively, in contrast to 7% of B6.p21^{-/-}

**Fig. 3.** Mortality curve of B6 mice overexpressing hBcl-2 in B cells and deficient in p21.

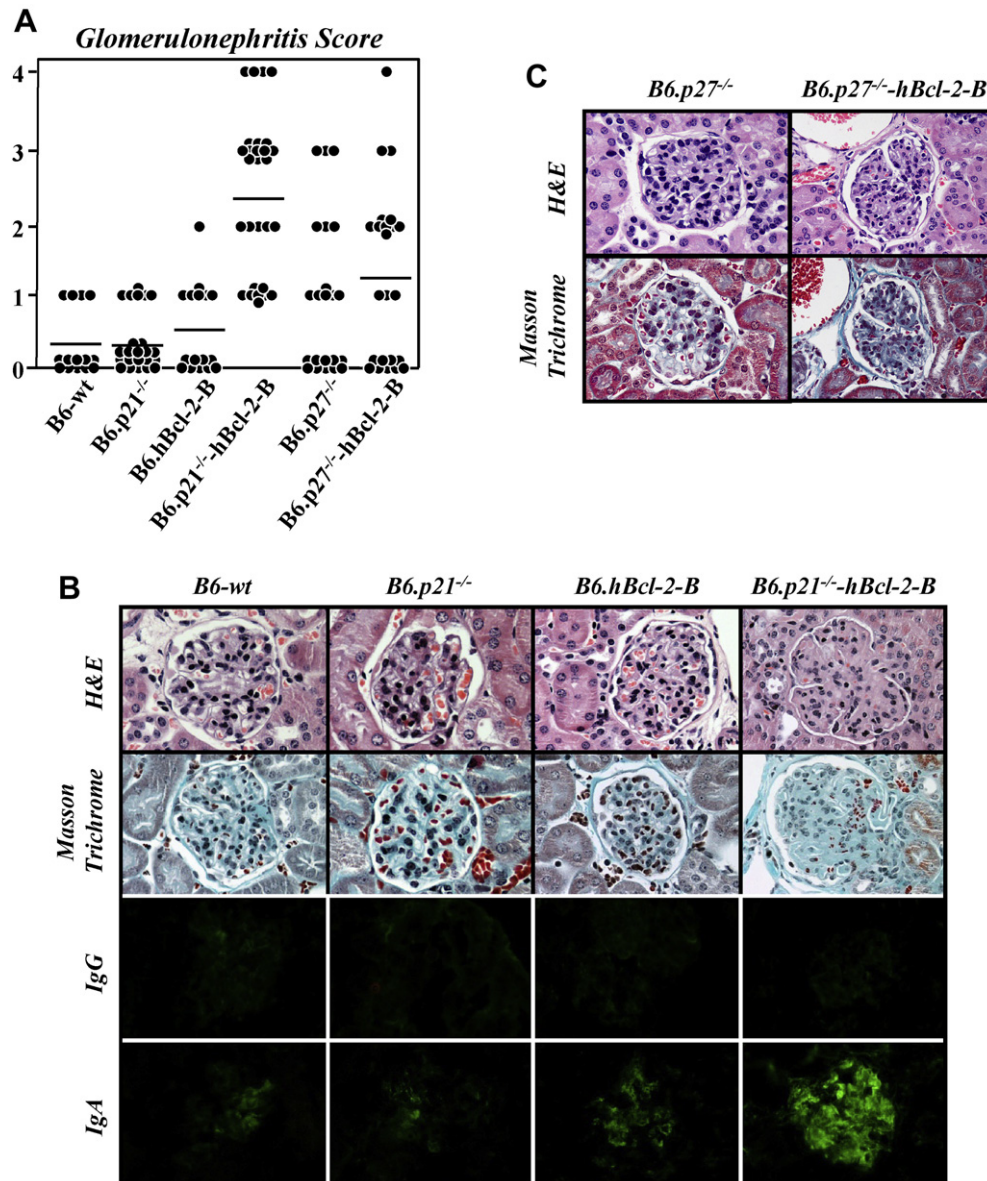


Fig. 4. Development of glomerulonephritis in B6 mice overexpressing hBcl-2 in B cells and deficient in p21 or p27. A) Glomerulonephritis score in the different strains of mice at the time of autopsy (B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice) or at 14–16 months of age (other groups). Values of individual mice are expressed. Bars represent the mean value of each group. B) Representative histological appearance of glomeruli (x40) from B6-wt, B6.p21^{-/-} and B6.hBcl-2-B Tg mice at 14–16 months of age and from B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice at the time of autopsy, stained with hematoxylin–eosin or Masson trichrome (two upper panels). Presence of IgG and IgA deposits (two lower panels) in the glomeruli of B6-wt, B6.p21^{-/-} and B6.hBcl-2-B Tg mice at 14–16 months of age and from B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice at the time of autopsy (x40). C) Representative histological appearance of glomeruli (x40) from 14 month-old B6.p27^{-/-} and B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice stained with hematoxylin–eosin or Masson trichrome.

mice presenting PLPD (Table 2). None of B6-wt and B6.hBcl-2-B Tg mice had B-cell malignancies at this age. Among the B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice that survived up to 18 months of age, 15% and 70% of animals presented PLPD and B-cell lymphomas, respectively (Table 2). In contrast, the respective incidences were 19% and 2% in B6.p21^{-/-} mice, and 0% and 17% in B6.hBcl-2-B Tg mice.

4. Discussion

The control of cell cycle and survival is essential for the maintenance of lymphoid homeostasis and self-tolerance. Disruption in the regulation of any of these processes in mice can lead to autoimmunity and/or LPD [1]. However, the development of pathology in these animals, particularly autoimmune diseases, is largely

influenced by the genetic background of the strains of mice studied [2,9–12]. Due to the polygenetic nature of autoimmune diseases, we have analyzed here the possible complementation between genetic defects affecting the regulation of lymphocyte survival (Bcl-2 overexpression) and proliferation (p21 or p27 deficiency) in the development of autoimmunity and LPD in mice with a non-autoimmune genetic background. We have demonstrated that the deficiency in the cell cycle regulator p21 and the overexpression of Bcl-2 in B cells in non-autoimmune B6 mice promote a lethal lupus-like syndrome characterized by autoAb production and an IgA nephropathy. This lupus-like syndrome associated to IgA nephropathy resembles that of (NZW × B6)F1 mice overexpressing hBcl-2 in B cells [2], supporting the importance of B-cell Bcl-2 deregulation in the pathogenesis of this particular form of experimental glomerulonephritis. In addition, B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg

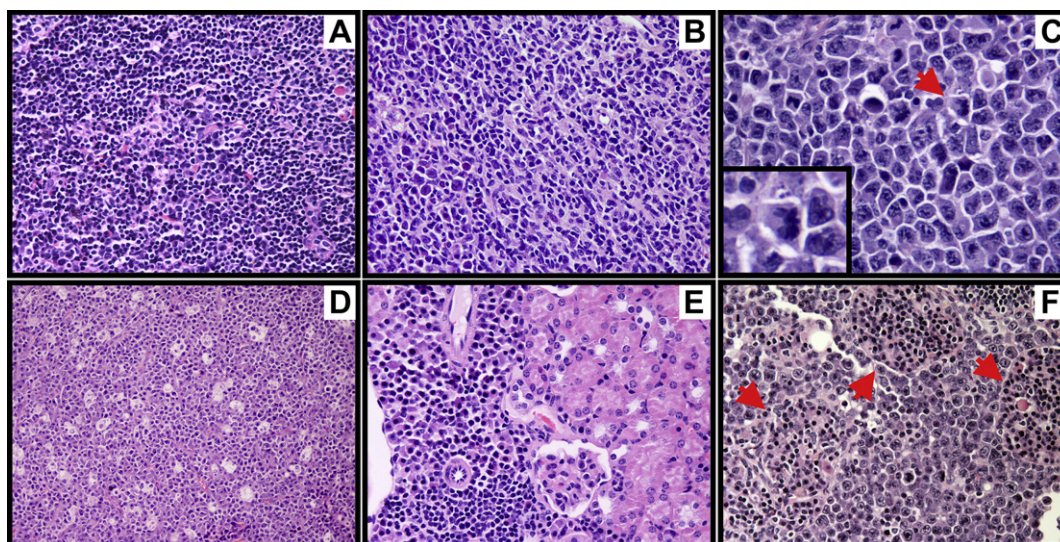


Fig. 5. Development of LPD in B6 mice overexpressing hBcl-2 in B cells and deficient in p21. A) PLPD in a lymph node from a 10 month-old B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (x40). B) PLPD in the lymph node of a 10 month-old B6.p21^{-/-} mice (x40). C) Immunoblastic B-cell lymphoma in a 14 month-old B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (x100) showing an aberrant mitosis (red arrow and squared amplification in the bottom left corner). D) Starry sky pattern of the immunoblastic B-cell lymphoma showed in B (x20). E) PLPD infiltrates in the kidney of an 18 month-old B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (x40). F) Immunoblastic B-cell lymphoma in the lymph node of a 18 month-old B6.hBcl-2-B Tg mice (x40) showing areas with PLPD (red arrows). For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

mice present a high incidence of B-cell LPD. In contrast, such cooperation for the development of autoimmunity is not observed in p27^{-/-} mice overexpressing Bcl-2 in B cells.

Our present results confirm the importance of the pro-autoimmune genetic predisposition for the complete manifestation of autoimmunity in mice deficient in p21. Recently, it has been shown that B6.p21^{-/-} mice develop mild lupus-like serological and glomerular abnormalities that do not modify the lifespan of these animals in comparison to mice deficient in p21 in an autoimmune-prone mixed (129/Sv × B6) genetic background [7,9]. This contrasts with the lack of development of even a mild lupus-like syndrome in our B6.p21^{-/-} mice, and the reasons for this discrepancy may be attributed to differences in animal housing conditions or to the origin of B6 colonies used in both studies. However, the fact that B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice develop a severe lupus-like syndrome clearly supports the idea that p21 deficiency acts as an autoimmunity enhancer that cooperates with hBcl-2 overexpression in B cells, thereby triggering severe autoimmune responses in normal mice. The beneficial effects of the treatment with a peptidyl mimic of p21, which inhibits the interaction between cyclin-dependent kinase 4 and type D cyclins, on the development of SLE in (NZB × NZW)F₁ females [8] further support this idea. In

contrast, other studies in BXSb mice or in a line of p21^{-/-} mixed (129/Sv × B6) mice, derived from an unknown number of intercrosses, claim that p21 deficiency may have irrelevant or even protective effects on disease development [10–12], suggesting the existence of unknown strain-specific genetic interactions that modulate the accelerator activity of this genetic abnormality in autoimmunity.

There are multiple evidences indicating that p27 is an important regulator of clonal anergy of T lymphocytes [13,14]. In this sense, p27 is required for transplantation tolerance induced by costimulatory blockade [31]. However, p27^{-/-} mice have failed to develop autoimmune diseases even in a (129/Sv × B6) genetic background [15]. Accordingly, we have been unable to demonstrate the presence of high titres of circulating autoAbs and glomerulonephritis in almost all B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice analyzed here, despite an expansion in memory B and T cells being observed in these animals. Recent studies have shown the presence of increased serum levels of autoAbs and mild glomerular lesions in B6.hBcl-2-B Tg mice deficient in the G₁/S cell cycle regulators E2F1 or E2F2, although the survival of these animals is similar to that of non-Tg controls [32,33]. Altogether, these and our present results indicate that the regulators of the G₁/S transition of the cell cycle are hot spot targets for the control of lymphocyte tolerance. However, not all the regulators of this critical cell cycle check point appear to influence lymphocyte tolerance to the same extent, there existing a certain hierarchy in which each genetic defect of these regulators exhibits different potentials to promote systemic autoimmune diseases in cooperation with genetic abnormalities that prolong B cell survival (at least Bcl-2 overexpression). In this hierarchy, the pro-autoimmune potential of p21 deficiency in cooperation with B-cell hBcl-2 overexpression is higher than that of E2F1 or E2F2 deficiency, which in turn is superior to that of p27 deficiency.

In addition to its anti-apoptotic activity, Bcl-2 is also involved in the control of cellular proliferation. In particular, the overexpression of Bcl-2 in lymphocytes or fibroblasts significantly delays the cell cycle entry of these cells after activation [29,30]. On the other hand, p21 may act as a survival factor in several cell types, including T lymphocytes [28]. Thus, epistatic interactions between p21 deficiency and Bcl-2 overexpression affecting the

Table 2
Increased incidence of B-cell malignancies in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice.

Mice	Type	8–10 months	18 months
B6-wt	PLPD	0/16 (0%)	0/12 (0%)
	B-cell lymphoma	0/16 (0%)	0/12 (0%)
B6.p21 ^{-/-}	PLPD	1/14 (7.1%)	8/43 (18.6%)
	B-cell lymphoma	0/14 (0%)	1/43 (2.3%)
B6.hBcl-2-B Tg	PLPD	0/18 (0%)	0/24 (0%)
	B-cell lymphoma	0/18 (0%)	4/24 (16.7%)
B6.p21 ^{-/-} -hBcl-2-B	PLPD	5/16 (31.3%)	4/26 (15.4%)
	B-cell lymphoma	7/16 (43.8%)	18/26 (69.2%)

Groups of the different mouse strains were sacrificed at 8–10 and 18 months of age. Sections of major organs were included in paraffin and stained with hematoxylin–eosin. The presence of LPD, either PLPD or B-cell lymphoma, was evaluated by two pathologists. Under the PLPD group, we included animals that presented only this type of LPD. Under the B-cell lymphoma group, we included animals that presented this type of LPD independently of the coexistence of PLPD.

survival and/or proliferation of B cells can be involved in the induction of severe autoimmunity in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice. However, the anti-apoptotic and anti-proliferative effects of hBcl-2 overexpression in B cells from B6.hBcl-2-B Tg mice are not modified by the presence of the p21 null mutation, indicating a dominant role of overexpressed Bcl-2 over p21 deficiency. Although p27 has been proposed as a critical mediator of the anti-proliferative function of Bcl-2 [30], our experiments clearly show that the proliferative defects observed in B cells overexpressing hBcl-2 are not restored by p27 deficiency. These results are fully in agreement with a recent report showing a similar cell cycle delay in anti-CD3 stimulated T cells from hBcl-2-T Tg and p27^{-/-}-hBcl-2-T Tg mice [21]. However, as our studies have been carried out on total B-cell populations, we cannot exclude the possibility that the interaction between p21 deficiency and Bcl-2 overexpression implicated in cell cycle progression and survival may be restricted to some minor subsets of activated/memory B cells (see below).

Consistent with a previous finding [7], our B6.p21^{-/-} mice exhibited an age-dependent enlargement of memory CD4⁺ T-cell subpopulation, and this is more pronounced in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice developing a severe SLE. However, we observed that non-autoimmune B6.p27^{-/-} and B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice had increased numbers of CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} T cells even at 2 months of age and at levels comparable to those of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice. These data strongly suggest that the expansion of these memory T cells in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice by itself is not sufficient to promote the disease.

It has been demonstrated that Bcl-2 overexpression extends the lifetime of memory B cells [34]. Accordingly, high numbers of B220⁺IgM⁻IgD⁻CD138⁻ memory B cell are found in B6.hBcl-2-B Tg mice even at 2 months of age. Parallel to the increase in memory CD4⁺ T cells, memory B cells are also expanded in B6.p21^{-/-} and B6.p27^{-/-} mice. However, whereas the size of this B cell population in B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice is similar to that of B6.hBcl-2-B Tg mice, a synergistic interaction between p21 deficiency and Bcl-2 overexpression seems to regulate the number of memory B cells in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice. This synergistic interaction may operate at two levels. First, and as in T cells [9], p21 can affect the proliferation of memory, but not naïve, B cells that survive activation-induced cell death (AICD) processes. Second, hBcl-2 overexpression can modulate the pro-apoptotic activity of Bim regulating the survival of memory B and autoAb-forming cells during AICD *in vivo* [35,36]. In this scenario, the abnormal expansion and/or survival of these B cells together with the increased number of memory CD4⁺ T cells may be the cause for the induction of SLE in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice.

A careful analysis of B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice at the time of autopsy indicates that in addition to the development of a lupus-like autoimmune syndrome associated with an IgA nephropathy, these mice present B-cell LPD with a much higher incidence than B6.p21^{-/-} or B6.hBcl-2-B Tg mice. Histologically, these LPD can be classified as PLPD and immunoblastic B-cell lymphomas. The coexistence of both types of LPD in many animals strongly suggests that these lesions may represent different stages of the same B-cell malignancy. Despite the absence of autoimmunity in B6.p27^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice (present study), we have observed the development of B-cell LPD in these animals that shortened their lifespan (Santiuste et al, manuscript in preparation). In this regard, it has been shown that p27^{-/-} mice overexpressing Bcl-2 in T lymphocytes spontaneously develop T-cell lymphomas with a high incidence [21]. At present, the mechanisms responsible for the development of B-cell LPD in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice are unknown. One possibility is that the same epistatic interaction between p21 deficiency and Bcl-2 overexpression promotes LPD in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice independently of the autoimmune

syndrome, as both B6.p21^{-/-} or B6.hBcl-2-B Tg mice develop with age B-cell malignancies without overt autoimmune diseases [16,17,19]. Additionally and/or alternatively, the development of B-cell LPD in B6.p21^{-/-}-hBcl-2-B Tg mice may be closely linked to the autoimmune process, secondary to the chronic activation of autoreactive B lymphocytes by non-tolerized CD4⁺ T cells. In this regard, the spontaneous development of B-cell lymphomas is common in different lupus-prone mice, such as NZB, Fas or FasL deficient and interleukin-12 receptor beta2 deficient mice [37–40]. Experiments are in course to clarify this important question.

Acknowledgements

We thank Dr Dimitri Balomenos, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, Spain, for mice and helpful suggestions, Dr Miguel A. Gonzalez-Gay, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain for comments to the manuscript, Maria Aramburu, Natalia Cobo, Consuelo Agüeros, Lorena San Cosme, María Sanchez and Iván Gómez for technical assistance. This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain to RM (SAF2008-02042) and JM (BFU2009-07206), by grants REDINREN RD06/0016 from the Instituto de Salud Carlos III and from Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Spain to RM, from the Fundación Marqués de Valdecilla, Spain to JM (API-07/02), by a grant from the Swiss National Foundation for Scientific Research to SI. FG is supported by a pre-doctoral fellowship from the Instituto Danone, Spain. The authors have no conflicting financial interests.

References

- [1] Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 2007; 130:25–35.
- [2] Marquina R, Díez MA, López-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand white x C57BL/6J)F1-bcl-2 transgenic mice. *J Immunol* 2004; 172:7177–85.
- [3] Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, et al. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8661–5.
- [4] Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999; 286:1735–8.
- [5] Bouillet P, Cory S, Zhang LC, Strasser A, Adams JM. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency are prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell* 2001; 1:645–53.
- [6] Vidal S, Kono DH, Theofilopoulos AN. Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Fas lpr mice. *J Clin Invest* 1998; 101:696–702.
- [7] Balomenos D, Martín-Caballero J, García MI, Prieto I, Flores JM, Serrano M, et al. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nat Med* 2000; 6:171–6.
- [8] Goulvestre C, Chéreau C, Nicco C, Mouthon L, Weill B, Batteux F. A mimic of p21WAF1/CIP1 ameliorates murine lupus. *J Immunol* 2005; 175:6959–67.
- [9] Arias CF, Ballesteros-Tato A, García MI, Martín-Caballero J, Flores JM, Martínez-A C, et al. p21CIP1/WAF1 controls proliferation of activated/memory T cells and affects homeostasis and memory T cell responses. *J Immunol* 2007; 178:2296–306.
- [10] Lawson BR, Kono DH, Theofilopoulos AN. Deletion of p21 (WAF-1/Cip1) does not induce systemic autoimmunity in female BXSB mice. *J Immunol* 2002; 168:5928–32.
- [11] Lawson BR, Baccala R, Song J, Croft M, Kono DH, Theofilopoulos AN. Deficiency of the cyclin kinase inhibitor p21(WAF-1/CIP-1) promotes apoptosis of activated/memory T cells and inhibits spontaneous systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2004; 199:547–57.
- [12] Santiago-Raber ML, Lawson BR, Dummer W, Barnhouse M, Koundouris S, Wilson CB, et al. Role of cyclin kinase inhibitor p21 in systemic autoimmunity. *J Immunol* 2001; 167:4067–74.
- [13] Boussiotis VA, Freeman GJ, Taylor PA, Berezovskaya A, Grass I, Blazar BR, et al. p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nat Med* 2000; 6:290–7.
- [14] Li L, Iwamoto Y, Berezovskaya A, Boussiotis VA. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat Immunol* 2006; 7:1157–65.

- [15] Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 1996;85:733–44.
- [16] Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5214–8.
- [17] McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991;349:254–6.
- [18] Strasser A, Harris AW, Cory S. E-mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 1993;8:1–9.
- [19] Bhatia K, Fan S, Spangler G, Weintraub M, O'Connor PM, Judde JG, et al. mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma. *Cancer Res* 1995;55:1431–5.
- [20] Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* 2001;61:6234–8.
- [21] Cheng N, van de Wetering CI, Knudson CM. p27 deficiency cooperates with Bcl-2 but not Bax to promote T-cell lymphoma. *PLoS One*; 2008;3. e1911.
- [22] Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JL, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995;377:552–7.
- [23] González J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, González-Gay MA, et al. CD4⁺CD25⁺ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol* 2007; 178:2778–86.
- [24] Grillot DA, Merino R, Pena JC, Fanslow WC, Finkelman FD, Thompson CB, et al. bcl-x exhibits regulated expression during B cell development and activation and modulates lymphocyte survival in transgenic mice. *J Exp Med* 1996;183:381–91.
- [25] López-Hoyos M, Carrió R, Merino R, Buelta L, Izui S, Núñez G, et al. Constitutive expression of bcl-2 in B cells causes a lethal form of lupuslike autoimmune disease after induction of neonatal tolerance to H-2b alloantigens. *J Exp Med* 1996;183:2523–31.
- [26] Merino R, Iwamoto M, Gershwin ME, Izui S. The Yaa gene abrogates the major histocompatibility complex association of murine lupus in (NZB x BXSb)F1 hybrid mice. *J Clin Invest* 1994;94:521–5.
- [27] Izui S, Higaki M, Morrow D, Merino R. The Y chromosome from autoimmune BXSb/Mp mice induces a lupus-like syndrome in (NZW x C57BL/6)F1 male mice, but not in C57BL/6 male mice. *Eur J Immunol* 1988;18:911–5.
- [28] Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2007;10:13–29.
- [29] Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, Cory S. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J* 1997;16:4628–38.
- [30] Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME, et al. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 2000;20:4745–53.
- [31] Rowell EA, Wang L, Hancock WW, Wells AD. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 is required for transplantation tolerance induced by costimulatory blockade. *J Immunol* 2006;177:5169–76.
- [32] Marín MJ, García I, Peña M, Bolívar A, Zubiaga A, López-Hoyos M. E2F1-/C57BL/6 mice overexpressing a human Bcl-2 transgene in B cells develop a mild autoimmune syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:156–65.
- [33] Marín-Vidal MJ, Bolívar A, Zubiaga A, López-Hoyos M. The combined effect of BCL-2 over-expression and E2F2 deficiency induces an autoimmune syndrome in non-susceptible mouse strain C57BL/6. *Autoimmunity* 2010;43:111–20.
- [34] Nuñez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, Sorensen CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991;353:71–3.
- [35] Hande S, Notidis E, Manser T. Bcl-2 obstructs negative selection of autoreactive, hypermutated antibody V regions during memory B cell development. *Immunity* 1998;8:189–98.
- [36] Fischer SF, Bouillet P, O'Donnell K, Light A, Tarlinton DM, Strasser A. Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* 2007;110:3978–84.
- [37] Bielschowsky M, Bielschowsky F. Reaction of the reticular tissue of mice with autoimmune haemolytic anaemia to 2-aminofluorene. *Nature* 1962; 194:692.
- [38] Marti GE, Metcalf RA, Raveche E. The natural history of a lymphoproliferative disorder in aged NZB mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 194:117–26.
- [39] Davidson WF, Giese T, Fredrickson TN. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas–Fas ligand interactions. *J Exp Med* 1998;187:1825–38.
- [40] Airolidi I, Di Carlo E, Cocco C, Sorrentino C, Fais F, Cilli M, et al. Lack of Il12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy. *Blood* 2005;106:3846–53.

