



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterització de l'activitat immunomoduladora de C4BP(β -). Mecanismes moleculars i eficàcia terapèutica en processos immune-inflamatoris

Inmaculada Serrano Santacruz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Programa de Doctorat en Biomedicina

2022

CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT IMMUNOMODULADORA DE C4BP(β -)

Mecanismes moleculars i eficàcia terapèutica
en processos immune-inflamatoris

Memòria presentada per Inmaculada Serrano Santacruz per optar al grau de
doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi doctoral realitzada al grup de Processos Immune-Inflamatoris i Teràpia
Gènica de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Doctoranda
Inmaculada Serrano Santacruz

Director
Josep M^a Aran Perramon

Tutora
Virginia Nunes Martínez

*El sistema inmunitario es como la vieja del visillo,
se entera de todo*

Dra. Sari Arponen

Agradecimientos

Pretendía llegar hasta aquí tranquila, porque si me estás leyendo ya me conoces, y si me conoces sabes lo mal que gestiono el estrés. Me salen cosas por todos lados. Entonces he planificado y estructurado cada etapa y pedido ayuda y comprensión cuando la necesitaba, que es muy de humanos, porque una vocecita diaria me decía que sería inevitable que me estresara. Y así de cierto es, porque nunca lo tenemos todo bajo control, aunque de vez en cuando está bien soltarlo. Y quién pudiera.

Pero lo cierto es que he disfrutado un poco del proceso y cuando me pregunto qué se termina ahora sólo pienso en que sea dejar un poco a un lado la silla y el ordenador y poder continuar con mis experimentos. Me siento muy afortunada por haber tenido la oportunidad de dedicar estos últimos seis años a hacer lo que me gusta, de sentir la libertad de poder idear, planificar y realizar a medida todo lo que constituye “el trabajo de laboratorio”, y que no me saquen de aquí. Sin duda, no se me ocurre mejor forma de empezar que dando las GRACIAS al Dr. Josep M^a Aran y a la Dra. Ana Luque por haberlo hecho realidad. Estoy muy agradecida por lo cómodo y satisfactorio que es trabajar en este equipo y por que forméis parte de mi día a día. Gracias también por todas esas cápsulas de conocimiento compartidas en las reuniones de grupo y en la sala de cultivos. Sin duda habéis contribuido a que sienta vocación por la investigación.

A Catarina, por todos los momentos tan divertidos que pudimos compartir trabajando mano a mano, te echo de menos. También a todos los estudiantes que han ido pasando y me han dado sus puntos de vista, ha sido muy enriquecedor; y a todo el equipo del Genética Molecular, tan dispuesto siempre a echar un cable.

En lo personal, primero a mis abuelos, los que no han podido verlo y los que, aunque no me vean tanto como les gustaría, siempre lo saben todo de mí. Al escepticismo tan cuidadoso de mi madre y a sus eternos abrazos para transmitirme que todo está bien y que está conmigo; y a la inocente curiosidad de mi padre, con una capacidad excepcional para hacerme sentir siempre a gusto. Gracias, gracias y gracias, por ser siempre el HOGAR y el REFUGIO. A mi hermana, más lejos de lo que me gustaría en muchas direcciones, pero en la más sentida, siempre presente. A mi padrino y a Nacho, por llevar al menos 5 años preguntándome por cómo llevaba la escritura de la tesis. No podría haberme tocado una familia más bonita, os llevo muy dentro de mí.

A Ainhoa, por ser mi sonrisa de cada mañana, porque a tu lado la vida es más fácil y más bonita, y estos meses, y todo el tiempo atrás, has sido un apoyo incuestionable. Gracias por haberme entendido cuando yo no me entendía y haberme brindado esa calma infinita. A Mambita, por sacarme a pasear cuando me tocaba descansar y por esas miradas (y poses) ensayadas para hacer que siempre tenga un rato para dejarlo todo y prestarte un ratito de mí. Sois una fuente inagotable del amor más puro.

A los cuchis, por estar siempre y preguntar y por llenar las escapadas, los fines de semana y las horas con tanto cariño; el mejor tiempo de calidad.

A Carlos y Lau porque hay cosas que el tiempo no separa y prevalecen, aunque deberíamos recordárnoslo más.

A las chicas del baile, Eva y Gemma, porque nos encontramos por casualidad y ahora, que la casualidad no nos une, estamos mucho más unidas. Sois imprescindibles para mí, terapia en vena.

A les Feres, porque es un gusto seguir sumando momentos y años juntos, y es muy bonito sentirlos siempre tan cerca. El tiempo no pasa a vuestro lado.

El tiempo no debería haber pasado en realidad y tú no deberías haberte ido. Deberías haber estado aquí conmigo. No es lo mismo llegar sin ti. Te has ido con un trozo de mi alma o de lo que sea tan profundo como para no dejar de dolerme ni un segundo. Tendrías que haber sido enfermero, antes que yo doctora. Ojalá hubiera sido así, ojalá te hubiese tenido que dar la razón; la razón y algún que otro abrazo, algún segundo más de decirte que te quiero y de mostrarte lo bonita de más que era la vida a tu lado. Aquí también hay un poco de todo lo que me enseñaste.

No se acaba nada, al contrario, seguro que es el inicio de muchas cosas. Y me siento con ganas de volver a querer y poder hacerlas. Por ahora, sólo finalizo esta tesis doctoral, que no ha sido nunca un objetivo si no la consecuencia inevitable del trabajo realizado.

Creer y crear, están a tan sólo una letra de distancia
(Albert Espinosa)

Y yo creo más gracias a que formáis parte de mi vida

CONTINGUT

LLISTAT DE TAULES	13
LLISTAT DE FIGURES	15
ABREVIATURES I ANGLICISMES	19
1. INTRODUCCIÓ	25
1.1 El sistema immunitari	27
1.1.1 El sistema immunitari innat	27
1.1.1.1 El sistema de complement	35
1.1.1.1.1 Receptors del sistema de complement	36
1.1.1.1.2 Regulació del sistema de complement	37
1.1.1.1.3 Funcions dels components i reguladors del sistema de complement	38
1.1.1.2 La resposta de fase aguda	41
1.1.2 El sistema immunitari adaptatiu	42
1.2 Les APCs: nexa entre la immunitat innata i la immunitat adaptativa	49
1.2.1 Ontogènia	49
1.2.2 Macròfags	50
1.2.3 Cèl·lules dendrítiques	51
1.2.3.1 Subtipus	51
1.2.3.2 Plasticitat funcional de les DCs: immunogenicitat i tolerància	53
1.3 Generació de tolerància immunològica induïda per proteïnes de fase aguda i proteïnes del sistema de complement	58
1.3.1 Proteïna d'unió a C4b (C4BP)	62
1.3.1.1 Estructura de C4BP	63
1.3.1.2 Biosíntesi i regulació de C4BP	65
1.3.1.3 Funcions de C4BP en relació amb la seva estructura	66
1.3.1.4 Funció immunomoduladora de C4BP(β -) sobre Mo-DCs	71
1.3.2 DCs tolerogèniques com a tractament en malalties autoimmunitàries i inflamatòries	74
1.4 Malalties autoimmunitàries i inflamatòries	75
1.4.1 Lupus eritematós sistèmic	76
1.4.1.1 Epidemiologia	77

1.4.1.2	Etiologia	77
1.4.1.3	Patogènesi del LES i desenvolupament de la NL	80
1.4.1.3.1	Desencadenament de la resposta immunitària: reconeixement d'antígens propis i formació d'ICs	81
1.4.1.3.2	La signatura de l'IFN: pDCs i DCs mieloides	82
1.4.1.3.3	La pèrdua de tolerància perifèrica: els limfòcits auto-reactius	83
1.4.1.4	Nefritis lúpica.....	84
1.4.1.4.1	Arquitectura glomerular	85
1.4.1.4.2	Patogènesi de la NL: la formació d'ELS i la disfunció renal	86
1.4.1.4.3	Classificació de la NL	89
1.4.1.5	Estratègies terapèutiques	91
1.4.1.6	Tractament actual del LES.....	93
1.4.1.7	Tractament de la NL.....	97
1.4.1.8	Models murins experimentals de LES i NL	98
1.4.1.8.1	New Zealand Black/New Zealand White F1 (NZBW F1)	100
1.4.1.8.2	Murphy Roths Large/Lymphoproliferation (MRL-lpr).....	101
1.4.2	Colitis ulcerosa	101
1.4.2.1	Epidemiologia	102
1.4.2.2	Etiologia	102
1.4.2.3	Estructura de la barrera intestinal	106
1.4.2.4	Patogènesi de la CU.....	108
1.4.2.4.1	Disfunció de la barrera epitelial	109
1.4.2.4.2	Activació de les cèl·lules innates: neutròfils i ILCs	110
1.4.2.4.3	La captura antigènica i activació de les APCs.....	111
1.4.2.4.4	Els limfòcits i les citocines com a mediadors i efectors de la resposta	112
1.4.2.5	Classificació clínica	116
1.4.2.6	Tractament actual	119
1.4.2.7	Models murins experimentals de CU	123
1.4.2.7.1	CU induïda per DSS	124
2.	OBJECTIUS	127
3.	METODOLOGIA	131
3.1	Models murins de LES amb NL	133
3.1.1	Obtenció i purificació de C4BP(β), C4BP(β -) i rC4BP(β -).....	133

3.1.1.1	SDS-PAGE i tinció Coomassie Blue	134
3.1.2	Generació de BM-DCs.....	134
3.1.3	Citometria de flux.....	135
3.1.4	Proteïnes i fàrmacs	135
3.1.5	Disseny experimental.....	135
3.1.6	Detecció d'anticossos anti-C4BP(β -) humana	140
3.1.7	Anàlisi de la funció renal: proteïnúria, albuminúria i BUN	140
3.1.8	Nivells d'anticossos anti-dsDNA.....	141
3.1.9	Histopatologia renal	141
3.1.10	Determinació immunofluorescent d'ICs i del sistema de complement dipositats sobre els ronyons.....	142
3.1.11	Assaig de l'activitat del complement	142
3.1.12	Immunohistoquímica	143
3.1.13	Assaig TUNEL.....	144
3.1.14	Anàlisi de l'expressió gènica diferencial.....	145
3.1.15	<i>Array</i> de citocines	147
3.1.16	ELISA: quantificació de la quimiocina CXCL13 (BLC)	148
3.1.17	Anàlisi estadístic	148
3.2	Model murí de CU induïda per DSS	149
3.2.1	Proteïnes i fàrmacs	149
3.2.2	Disseny experimental.....	149
3.2.3	Histopatologia en colon distal	152
3.2.4	SDS-PAGE i anàlisi per Western Blot	153
3.2.5	ELISA: quantificació del nivell d'endotoxines en sèrum.....	153
3.2.6	Anàlisi de l'expressió gènica diferencial.....	153
3.2.7	ELISA: quantificació de S100a8/S100a9 (calprotectina)	154
3.2.8	<i>Array</i> de citocines	154
3.2.9	ELISA: quantificació de la quimiocina CXCL13 (BLC)	155
3.2.10	Immunohistoquímica	155
3.2.11	Anàlisi estadístic	155
3.3	Caracterització de la variant immunomoduladora PRP6-HO7	156
3.3.1	Obtenció i purificació de C4BP(β -) nua, PRP5/8-HO7, PRP6-HO7 i PRP6-NO.....	156
3.3.2	SDS-PAGE i anàlisi per Western Blot	159

3.3.3	Assaig de l'activitat inhibidora del complement de C4BP com a cofactor en l'escissió de C4b	160
3.3.4	Efecte de PRP6-HO7 sobre Mo-DCs.....	161
3.3.4.1	Obtenció de Mo-DCs	161
3.3.4.1.1	Detecció de SARS-CoV2 per RT-qPCR en mostres de sang	161
3.3.4.1.2	Aïllament de PBMCs de sang perifèrica	162
3.3.4.1.3	Obtenció i purificació de monòcits CD14 ⁺	164
3.3.4.1.4	Quantificació i avaluació de la puresa dels monòcits CD14 ⁺ obtinguts	164
3.3.4.1.5	Diferenciació de monòcits a DCs.....	165
3.3.4.2	Maduració de les DCs	166
3.3.4.3	Assaig d'activació via TLRs	166
3.3.4.4	Cultiu amb sèrum humà autòleg	167
3.3.4.5	Citometria de flux	167
3.3.4.6	Avaluació de la capacitat endocítica de les Mo-DCs.....	168
3.3.4.7	Assaig de quimiotaxi.....	169
3.3.4.8	Proliferació de limfòcits T al·logènics	170
3.3.4.8.1	Obtenció i purificació de limfòcits T CD3 ⁺	170
3.3.4.8.2	Reacció limfocitària mixta	171
3.3.4.8.3	Tinció de citocines intracel·lulars	172
3.3.4.9	ELISA: secreció de citocines IL-12p70, TNF- α i IL-10	172
3.3.5	Efecte de PRP6-HO7 en Mo-DCs i Mo-macròfags obtinguts de pacients amb LES	172
3.3.6	Efecte de PRP6-HO7 com a tractament experimental en el model murí de CU aguda induïda per DSS	173
3.3.7	Anàlisi estadístic	174
4.	RESULTATS	175
4.1	L'activitat immunomoduladora de C4BP(β-) limita el desenvolupament de la NL	177
4.1.1	Avaluació de la puresa de les proteïnes C4BP(β +) i C4BP(β -).....	177
4.1.2	C4BP(β -) confereix un fenotip anti-inflamatori en BM-DCs	178
4.1.3	C4BP(β -) preserva la funció renal en el model murí NZBW F1	179
4.1.4	C4BP(β -) atenua el desenvolupament d'anticossos anti-dsDNA en el model murí NZBW F1	182

4.1.5	C4BP(β -) millora l'afectació histològica renal dels ratolins NZBW F1	182
4.1.6	Els dipòsits d'ICs i el nombre de cèl·lules apoptòtiques renals disminueixen significativament en els ratolins NZBW F1 tractats amb C4BP(β -)	184
4.1.7	El tractament amb C4BP(β -) està dirigit cap a <i>hallmarks</i> moleculares/cel·lulars característics de la NL.....	186
4.1.8	C4BP(β -) modula el patró d'expressió de citocines en el model murí NZBW F1	190
4.1.9	El tractament amb C4BP(β -) evita la infiltració leucocitària i el desenvolupament d'ELS en el parènquima renal dels ratolins NZBW F1	192
4.1.10	L'activitat inhibidora del complement de C4BP no té efecte sobre la patologia de la NL en els ratolins NZBW F1	195
4.1.11	Eficàcia terapèutica de C4BP(β -) en el model murí de LES MRL-lpr.....	197
4.2	L'activitat immunomoduladora de C4BP(β-) limita el desenvolupament de la CU.....	199
4.2.1	C4BP(β -) millora els trets patològics i disminueix l'activitat de la malaltia en el model murí de CU aguda induïda per DSS.....	199
4.2.2	C4BP(β -) millora l'estat inflamatori macroscòpic del colon	202
4.2.3	C4BP(β -) preserva histològicament l'estructura del colon distal	203
4.2.4	C4BP(β -) preserva la integritat de les unions estretes en l'epiteli intestinal	204
4.2.5	C4BP(β -) disminueix els nivells d'endotoxina circulants.....	205
4.2.6	C4BP(β -) modula el perfil transcripcional de marcadors d'inflamació aguda característics de la CU en el teixit intestinal.....	207
4.2.7	C4BP(β -) modula el perfil de citocines i quimiocines sèriques en el model murí de CU aguda induïda per DSS	209
4.2.8	C4BP(β -) disminueix la infiltració de cèl·lules immunitàries en el colon del ratolins amb CU induïda per DSS	212
4.3	Caracterització de l'activitat immunomoduladora de PRP6-HO7 sobre Mo- DCs.....	214
4.3.1	La cadena β interfereix en l'activitat immunomoduladora de C4BP	214
4.3.2	La modularitat de C4BP permet la dissecció de la seva activitat immunomoduladora	217
4.3.3	L'oligomerització és necessària per preservar l'activitat immunomoduladora de PRP6-HO7	219

4.3.4	PRP6-HO7 no presenta activitat inhibidora del complement.....	223
4.3.5	PRP6-HO7 atenua l'activació de les Mo-DCs induïda via TLRs	224
4.3.6	El sèrum humà no interfereix en l'activitat immunomoduladora de PRP6-HO7	227
4.3.7	PRP6-HO7 modifica la quimiotaxi de Mo-DCs	228
4.3.8	Les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7 no indueixen l'alloproliferació de cèl·lules T.....	229
4.3.9	PRP6-HO7 modula l'activació intrínseca i mediada per TLRs de les Mo-DCs de pacients amb LES autoimmunitari actiu.....	230
4.3.10	PRP6-HO7 millora els trets patològics macroscòpics i histopatològics en el model murí de CU aguda induïda per DSS.....	238
5.	DISCUSSIÓ	241
5.1	Potencial terapèutic de C4BP(β -) en els models murins de NL i CU	246
5.2	Dissecció i caracterització de l'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) i avaluació del potencial terapèutic de PRP6-HO7	256
5.3	C4BP(β -) i PRP6-HO7 com a inductors de tolerogènesi en Mo-DCs per al tractament de malalties immune-inflamatòries	262
6.	CONCLUSIONS	269
7.	BIBLIOGRAFIA	273
	ANNEXES I PUBLICACIONS	313

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Receptors principals del sistema de complement i les seves funcions	37
Taula 2. Gens de risc en el LES classificats per cada via	79
Taula 3. Classificació de la NL per la ISN/RPS	90
Taula 4. Definició de LLDAS en el LES.....	92
Taula 5. Definició de remissió en el LES.....	92
Taula 6. Definició de resposta completa i resposta parcial a nivell renal en el tractament de la NL	93
Taula 7. Comparativa de les manifestacions característiques del LES en humans i en ratolins.....	99
Taula 8. Comparativa del mètode d'acció i els avantatges i inconvenients dels diferents models murins espontanis i induïts de LES	100
Taula 9. Influència de les citocines rellevants en la patogènesi de la CU	115
Taula 10. Criteris avaluats pel sistema de puntuació Mayo en la CU	118
Taula 11. Anticossos utilitzats en immunohistoquímica del parènquima renal en el model de LES NZBW F1	144
Taula 12. Perfil tèrmic de la RT-qPCR amb <i>Custom TaqMan Low Density Array Cards</i> utilitzada en el model murí de LES NZBW F1.....	145
Taula 13. Perfil tèrmic de la RT-qPCR per a la validació utilitzada en el model murí de LES NZBW F1.....	146
Taula 14. Citocines, quimiocines i proteïnes de fase aguda analitzades pel <i>Mouse Cytokine Array Panel A</i>	148
Taula 15. Grups experimentals i administració del tractament en el model de CU induïda per DSS.....	150
Taula 16. Càlcul del DAI en el model murí de CU induïda per DSS.....	151
Taula 17. Puntuació macroscòpica en el model murí de CU induïda amb DSS.....	152
Taula 18. Anticossos utilitzats en l'avaluació de C4BP(β)-PS, C4BP(β) nua, PRP6-HO7 i PRP6-NO.....	160
Taula 19. Perfil tèrmic de la RT-qPCR per a la detecció de SARS-CoV2	162
Taula 20. Funcions biològiques rellevants associades amb l'expressió gènica diferencial a nivell renal dels ratolins NZBW F1 tractats amb C4BP(β -) (IPA®).....	187

Taula 21. Vies biològiques involucrades en l'expressió gènica renal <i>downregulades</i> pel tractament amb C4BP(β -) en el model NZBW F1 (PathwAX).....	189
Taula 22. Valors obtinguts a partir del DAI i de la variació del pes corporal en els grups d'estudi del model de CU experimental induïda per DSS	200
Taula 23. Característiques clíniques dels pacients de LES de la cohort 1.....	231
Taula 24. Característiques clíniques dels pacients de LES de la cohort 2.....	234
Taula A1. Llista dels gens rellevants en el LES inclosos en el <i>TaqMan Low Density Array</i> customitzat.....	313
Taula A2. Llista de gens induïts pel tractament amb C4BP(β -) ($FC \geq 1.8$)	322
Taula A3. Llista de gens induïts pel tractament amb CYP ($FC \geq 1.8$)	323

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Estratègies de reconeixement en el sistema immunitari innat	30
Figura 2. Localització i factors desencadenants de l'activació dels TLRs.....	31
Figura 3. Vies de senyalització activades per TLRs	33
Figura 4. Visió general de les vies d'activació del sistema de complement amb les seves funcions	40
Figura 5. Ontogènia i diferenciació dels diferents subtipus de DCs presents en els teixits	52
Figura 6. Característiques fenotípiques i funcionals de les DCs durant el seu procés d'activació i maduració	54
Figura 7. Representació estructural de la cadena α de C4BP	63
Figura 8. Representació estructural de la cadena β de C4BP.....	64
Figura 9. Representació estructural de les proteïnes C4BP($\beta+$) i C4BP($\beta-$)	64
Figura 10. Representació esquemàtica de l'activitat de C4BP com a cofactor en l'escissió de C4b pel FI	67
Figura 11. Funcions fisiològiques de C4BP($\beta-$) en la resposta immune-inflamatòria cel·lular.....	73
Figura 12. El rol dual del sistema immunitari en la salut i la malaltia.....	75
Figura 13. Desenvolupament del procés immunitari en el LES	80
Figura 14. Estructura del corpuscle renal.....	86
Figura 15. Organització dels fol·licles limfoides ectòpics	88
Figura 16. Representació gràfica de les característiques estructurals d'un únic capil·lar glomerular afectat per glomerulonefritis lúpica	89
Figura 17. Estructura de les criptes intestinals	107
Figura 18. Representació dels canvis que contribueixen a la patogènesi de la CU	108
Figura 19. Vies de diferenciació de les cèl·lules T <i>naïve</i> en la CU.....	115
Figura 20. Classificació de Montreal segons extensió i localització de la CU	117
Figura 21. Pauta de tractament en el model murí de LES NZBW F1 per a l'avaluació del potencial de C4BP($\beta-$).....	136
Figura 22. Pauta de tractament en el model murí de LES NZBW F1 per a l'avaluació del potencial de C4BP($\beta-$) a dosi baixa	137

Figura 23. Pauta de tractament en el model murí de LES NZBW F1 per a l'avaluació de l'efecte de l'administració de C4BP(β +)	137
Figura 24. Pauta de tractament en el model murí de LES MRL-lpr per a l'avaluació del potencial de C4BP(β -)	138
Figura 25. Pauta de tractament en el model animal de CU induïda per DSS per a l'avaluació del potencial de C4BP(β -)	150
Figura 26. Representació estructural de les proteïnes utilitzades en l'estudi per a la caracterització de la variant immunomoduladora PRP6-HO7	158
Figura 27. Representació gràfica del procés d'obtenció de PBMCs a partir de sang total	163
Figura 28. Representació gràfica de l'assaig de quimiotaxi amb Mo-DCs	169
Figura 29. Pauta d'administració en el model murí de CU induïda per DSS en l'avaluació del potencial de C4BP(β -) i PRP6-HO7	173
Figura 30. Anàlisi electroforètic de les isoformes C4BP(β +) i C4BP(β -) humanes purificades de plasma	177
Figura 31. C4BP(β -) humana disminueix l'expressió de les molècules co-estimuladores CD80 i CD86 en BM-DCs estimulades amb gardiquimod	178
Figura 32. Determinació de la funció renal en el model NZBW F1	180
Figura 33. Desenvolupament d'anticossos anti-C4BP(β -) humana en els ratolins NZBW F1	180
Figura 34. Determinació de la funció renal i supervivència dels ratolins NZBW F1 després de l'administració subcutània de rC4BP(β -) a dosi baixa	181
Figura 35. Producció d'autoanticossos en els ratolins NZBW F1 al llarg de l'estudi	182
Figura 36. Avaluació de la histologia renal en el model de LES NZBW F1	183
Figura 37. Anàlisi immunohistoquímic dels dipòsits d'IgG i C3 en el model murí de LES NZBW F1	184
Figura 38. Avaluació del nivell d'apoptosi en el còrtex renal dels ratolins NZBW F1185	
Figura 39. Comparativa del perfil transcripcional del teixit renal en el model murí de LES NZBW F1	186
Figura 40. Validació en mostres individuals per RT-qPCR de tots els gens que van mostrar una inducció $FC \geq 2$ en el perfil transcripcional corresponent al tractament amb C4BP(β -)	188
Figura 41. Perfil de citocines circulants en el model murí de LES NZBW F1	190
Figura 42. Perfil de citocines en teixit renal en el model murí de LES NZBW F1	191

Figura 43. Nivells de quimiocina CXCL13 circulants i en teixit renal	191
Figura 44. Immunohistoquímica del còrtex renal dels ratolins NZBW F1	193
Figura 45. C4BP(β^-) evita el desenvolupament d'ELS en el model de LES NZBW F1	194
Figura 46. Determinació patològica comparativa de la NL en els ratolins NZBW F1 després de l'administració de les dues isoformes de C4BP: C4BP(β^+) i C4BP(β^-)	196
Figura 47. Efecte del tractament amb C4BP(β^+) i C4BP(β^-) en l'activitat de la via clàssica del complement en el sèrum dels ratolins NZBW F1	197
Figura 48. C4BP(β^-) atenua les manifestacions clíniques característiques del LES en el model murí MRL-lpr.....	198
Figura 49. Variació del pes corporal en el model murí de CU induïda per DSS	200
Figura 50. C4BP(β^-) disminueix el DAI en els ratolins amb CU induïda per DSS	201
Figura 51. Efecte de C4BP(β^-) sobre els paràmetres macroscòpics intestinals en el model de CU induïda per DSS	203
Figura 52. Avaluació histopatològica del colon distal en el model murí de CU induïda per DSS.....	204
Figura 53. Expressió de les proteïnes de les unions estretes analitzada per Western Blot.....	205
Figura 54. Nivells d'endotoxina sèrica en els ratolins amb CU induïda per DSS.....	206
Figura 55. Anàlisi transcripcional de marcadors inflamatoris en mostres individuals de teixit intestinal per RT-qPCR en el model murí de CU induïda per DSS.....	207
Figura 56. Nivells de S100a8/S100a9 (calprotectina) en teixit intestinal	208
Figura 57. Perfil de citocines i quimiocines sèriques en els diferents grups del model murí experimental de CU induïda per DSS	211
Figura 58. Immunohistoquímica en mostres de colon dels ratolins del model de CU induïda per DSS.....	213
Figura 59. C4BP(β^+) nua no presenta unida PS	215
Figura 60. La cadena β de C4BP inhibeix l'activitat immunomoduladora del domini intern CCP6 de la cadena α	216
Figura 61. Disseny de les variants de C4BP recombinants: PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7	217
Figura 62. La deleció dels dominis associats a la inhibició del complement de C4BP(β^-) no afecta a la seva activitat immunomoduladora	218

Figura 63. Modelatge molecular de PRP6-HO7.....	219
Figura 64. Anàlisi estructural de PRP6-HO7 i PRP6-NO	220
Figura 65. L'oligomerització és necessària per preservar l'activitat immunomoduladora del domini CCP6 de la cadena α de C4BP	222
Figura 66. PRP6-HO7 no té activitat inhibidora del complement	223
Figura 67. PRP6-HO7 evita l'activació pro-inflamatòria induïda via TLRs de superfície en Mo-DCs	225
Figura 68. PRP6-HO7 evita l'activació pro-inflamatòria induïda via TLRs intracel·lulars (endosomals) en Mo-DCs	226
Figura 69. PRP6-HO7 disminueix l'expressió de CD83 i CD86 en Mo-DCs activades amb LPS i cultivades amb un 50% de sèrum humà.....	227
Figura 70. PRP6-HO7 disminueix l'expressió de CCR7 i modifica la quimiotaxi de les DCs	228
Figura 71. Les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7 limiten la proliferació de cèl·lules T i la producció d'INF- γ	229
Figura 72. PRP6-HO7 mostra activitat immunomoduladora sobre Mo-DCs de pacients de LES.....	232
Figura 73. L'expressió dels marcadors de superfície cel·lular en Mo-DCs i Mo-macròfags correlaciona amb les característiques clíniques de l'activitat de la malaltia nefrítica en pacients de LES.....	235
Figura 74. PRP6-HO7 modula els marcadors d'activació de la superfície cel·lular intrínsecament activats en Mo-DCs i Mo-macròfags de pacients de LES autoimmunitari actiu.....	237
Figura 75. PRP6-HO7 millora els trets patològics associats a l'activitat inflamatòria i preserva l'estructura histològica del colon distal en el model murí de CU induïda per DSS.....	239

ABREVIATURES I ANGLICISMES

7-AAD	7-aminoactinomicina D
Ab	Anticòs
AHR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
ANA	Anticòsos anti-nuclears
ANCA	Anticòsos contra el citoplasma de neutròfils
APC	Aloficocianina
APCs	Cèl·lules presentadores d'antigen
AUC	Àrea sota la corba
BAFF/BLyS	Factor activador de cèl·lules B
Bcl-6	Proteïna 6 del limfoma de cèl·lules B
BCR	Receptor de la cèl·lula B
BM-DCs	Cèl·lules dendrítiques derivades de progenitors de la medul·la òssia
Breg	Cèl·lules B reguladores
BSA	Albúmina sèrica bovina
BUN	Nitrogen provinent de la urea en sang
C	Component del complement
C4BP	Proteïna d'unió a C4b
C4BP(β-)	Isoforma de C4BP plasmàtica sense cadena β
C4BP(β+)	Isoforma de C4BP plasmàtica amb cadena β (i PS)
CaMK IV	Proteïna quinasa dependent de calci/calmodulina tipus IV
CCL	Lligand de quimiocines de tipus CC
CCP	<i>Complement control protein</i>
CCR	Receptor de quimiocines de tipus CC
CD	<i>Clúster</i> de diferenciació
CD40L	Lligand de CD40
cDCs	Cèl·lules dendrítiques convencionals
CDPs	Progenitors de cèl·lules dendrítiques
CEEAH	Comitè Ètic d'Experimentació en Animals i Humans
CFSE	Èster de succinimidil-carboxifluoresceïna
CGs	Centres germinals
cMoPs	Progenitors de monòcits
CR	Receptor del complement
CRlg	Receptor del complement de la família de les immunoglobulines
CRP	Proteïna C reactiva
CTLA-4	Proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics
CU	Colitis ulcerosa
CXCL	Lligand de quimiocines de tipus CXC
CXCR	Receptor de quimiocines de tipus CXC
CYP	Ciclofosfamida

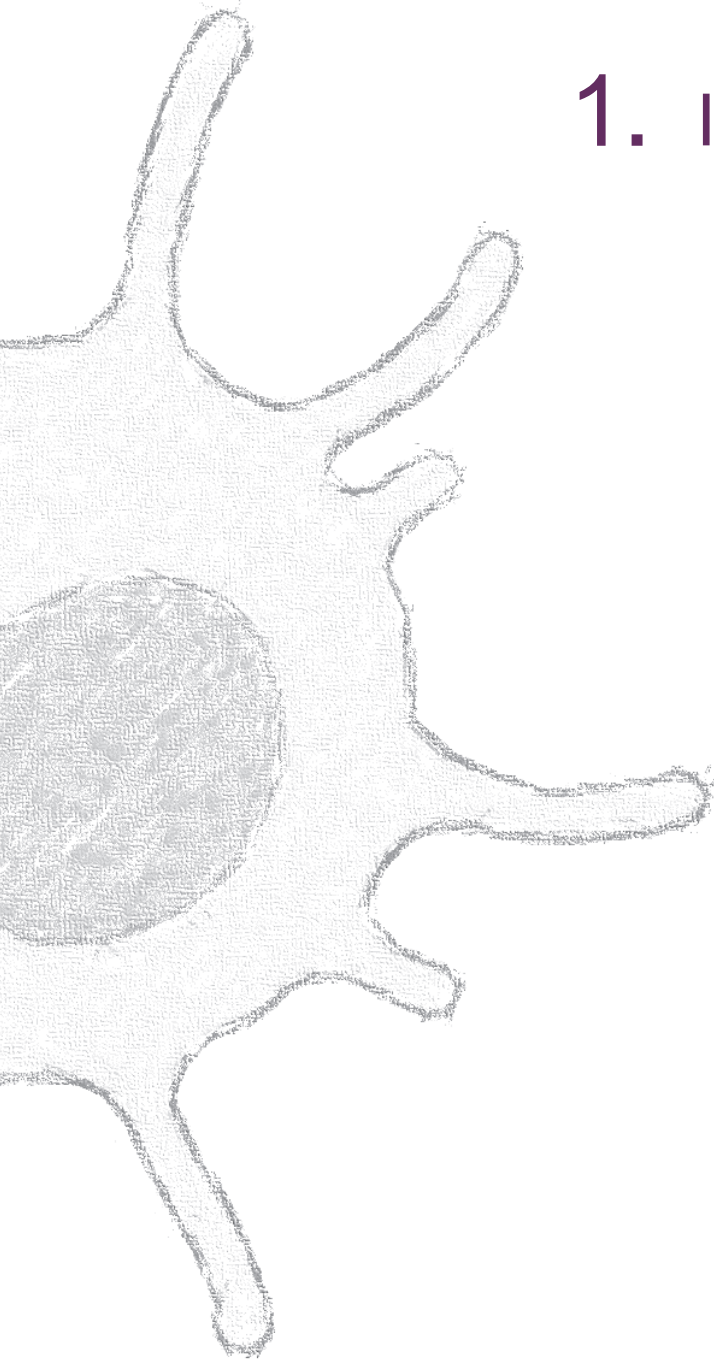
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAF	Factor accelerador del decaïment
DAI	Índex d'activitat de la malaltia
DAMPs	Patrons moleculars associats al dany
DCs	Cèl·lules dendrítiques
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DO	Domini d'oligomerització
D.O.	Densitat òptica
DORIS	<i>Definitions Of Remission In SLE</i>
dsDNA	DNA de cadena doble
dsRNA	RNA de cadena doble
DSS	Dextrà sulfat sòdic
ECCO	Organització Europea de Crohn i Colitis
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	Assaig per immunoabsorció lligat a enzims
ELS	Estructures limfoides ectòpiques
EULAR/ ERA-EDTA	<i>European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association</i>
FBSi	Sèrum fetal boví inactivat
FC	<i>fold change</i>
FcR	Receptors per a la regió Fc de les immunoglobulines
fDCs	Cèl·lules dendrítiques fol·liculars
FI	Factor I
FITC	Fluoresceïna
FLA-ST	Flagellin <i>S. typhimurium</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí
gcs	<i>glomerular cut section</i>
GM-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags
GMDPs	Progenitors de granulòcits, monòcits i cèl·lules dendrítiques
gp130	Component del receptor de senyalització compartit per les citocines de la família IL-6
GWAS	Estudis d'associació del genoma complet
HKLM	Heat-killed <i>Listeria monocytogenes</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSCs	Cèl·lules mare hematopoètiques
ICAM	Molècula d'adhesió intercel·lular
ICOS	Co-estimulador induïble de cèl·lules T
ICOSL	Ligand del co-estimulador induïble de cèl·lules T
ICs	Immunocomplexes

iDCs	Cèl·lules dendrítiques immadures
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IF	Immunofluorescència
IFN	Interferó
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
IL-1ra	Receptor antagonista d'interleucina-1
ILC	Cèl·lula limfoide de tipus innat
ILT3	Transcrit de tipus immunoglobulina 3
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IQR	Rang interquartílic
IRF	Factor regulador de l'interferó
ISN/RPS	Societat Internacional de Nefrologia/Societat de Patologia Renal
JAK	Quinasa Janus
KC	Quimiocina derivada de queratinòcits
kDa	Kilodalton
KEGG	Enciclopèdia de Gens i Genomes de Kyoto
LAIR-1	Receptor de tipus immunoglobulina associat a leucòcits 1
LES	Lupus eritematós sistèmic
LLDAS	<i>Lupus Low Disease Activity State</i>
LPS	Lipopolisacàrid
LRP	Receptor de lipoproteïnes de baixa densitat
M0	Macròfags no activats/polaritzats
M1	Macròfags clàssicament activats
M2	Macròfags alternativament activats
M-CSF	Factor estimulant de colònies de macròfags
mAb	Anticòs monoclonal
MadCAM-1	<i>Mucosal adressin cell adhesion molecule 1</i>
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MASP	Serina proteasa associada a MBL
MBL	Lectina d'unió a manosa
MCP	Proteïna cofactora de membrana
MCP-1	Proteïna quimiotàctica de monòcits
mDCs	Cèl·lules dendrítiques madures
MDPs	Progenitors comuns de monòcits i cèl·lules dendrítiques
MDSC	Precursor mieloid de cèl·lules supressores
ME	Microscòpia electrònica
MFI	Intensitat mitjana/mediana de fluorescència
MHC	Complex major d'histocompatibilitat
MIP	Proteïna inflammatòria de macròfags
MO	Microscòpia òptica
Mo-DCs	Cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits

Mo-macròfags	Macròfags derivats de monòcits
MMP	Metal·loproteasa
MRL-lpr	Murphy Roths Large/Lymphoproliferation
mRNA	RNA missatger
MDSC	Cèl·lules supressores d'origen mieloide
MyD88	Via de resposta primària de diferenciació mieloide 88
NETosi	Producció de trampes extracel·lulars de neutròfils
NETs	Trampes extracel·lulars de neutròfils
NF-κB	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres κ de les cèl·lules B activades
NK	<i>Natural killer</i>
NL	Nefritis lúpica
NLR	Receptor de tipus NOD
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NR	Condicions no reductores
NZBW F1	New Zealand Black/New Zealand White F1
p/v	pes/volum
PAMPs	Patrons moleculars associats a patògens
PBMCs	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PBS	Tampó fosfat salí
PD	Proteïna de mort cel·lular programada
pDCs	Cèl·lules dendrítiques plasmacitoides
PD-L	Lligand de la proteïna de mort cel·lular programada
PE	Ficoeritrina
PGA	<i>Physician Global Assesment</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PO	Via oral
Poly (I:C) HMW	<i>High molecular weight polyinosine-polycytidylic acid</i>
Poly (I:C) LMW	<i>Low molecular weight polyinosine-polycytidylic acid</i>
PRP5/8-HO7	<i>Proline-rich Protein domains CCP5-CCP8 heptamerized</i>
PRP6-HO7	<i>Proline-rich Protein domain CCP6 heptamerized</i>
PRP6-NO	<i>Proline-rich Protein domain CCP6 not oligomerized</i>
PRR	Receptor de reconeixement de patrons
PS	Proteïna S anticoagulant dependent de vitamina K
PTX3	Pentraxina 3
PU.1	Factor de transcripció <i>SFFV proviral Integration 1</i>
R	Condicions reductores
rC4BP(β-)	Isoforma de C4BP sense cadena β recombinant
RCA	Reguladors de l'activació del complement
rhGM-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags recombinant humà
rhIL-4	Interleuquina-4 recombinant humana

RIG	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLR	Receptor de tipus RIG
rmGM-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags recombinant de ratolí
RNA	Àcid ribonucleic
ROR- γ t	Receptor γ t orfe relacionat amb el receptor d'àcid retinoic
RT-qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa amb transcriptasa reversa
SAA	Proteïna sèrica amiloide A
SAP	Proteïna sèrica amiloide P
SC	Via subcutània
SCFA	Àcids grassos de cadena curta
SCR	<i>Short consensus repeat</i>
SD	Desviació estàndard
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SMOC	Centre d'organització supramolecular
SSC	<i>Side scatter</i>
ssDNA	DNA de cadena simple
ssRNA	RNA de cadena simple
STAT	Transductor de senyal i activador de la transcripció
TCR	Receptor de la cèl·lula T
TGF- β	Factor de creixement transformant β
Th	Limfòcits T <i>helper</i> o col·laboradors
Thf	Limfòcits T <i>helper</i> fol·liculars
TIMP-1	Inhibidor 1 de metal·loproteases
TLR	Receptor de tipus <i>toll</i>
TMB	3,3',5,5' -tetrametilbenzidina
TNBS	Àcid 2,4,6-trinitrobenzenosulfònic
TNF- α	Factor de necrosi tumoral α
TRAIL	Lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb TNF
Treg	Limfòcits T reguladors
TREM-1	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
TRIF	Factor inductor de interferó β que conté el domini <i>toll</i> / IL-1R
TSLP	Limfopoiètica estromal tímica
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling</i>
u.a.	unitats arbitràries
v/v	volum/volum
ZO	<i>Zonula occludens</i>

1. INTRODUCCIÓ



1.1 El sistema immunitari

El sistema immunitari és la unitat funcional responsable de la integritat de l'individu ja que, com tots els organismes vius, a cada moment aquest és desafiat per agents patogènics externs, com els microorganismes (bacteris, virus, paràsits i fongs); o interns, com les cèl·lules pròpies alterades. Aquests estímuls desencadenen en l'organisme l'enviament de senyals d'alerta que inicien la resposta per part d'aquest sistema, connectant tota una xarxa interactiva d'òrgans limfoides, cèl·lules i factors humorals per tal d'eliminar aquesta amenaça d'una manera controlada, sense posar en perill la pròpia supervivència i garantint un estat de salut (1). Amb aquest objectiu, es desenvolupen dos tipus de respostes immunitàries: la resposta immunitària innata i la resposta immunitària adaptativa.

1.1.1 El sistema immunitari innat

La resposta immunitària innata, també anomenada natural o inespecífica constitueix la primera línia de defensa en l'hoste. Es defineix com innata perquè els mecanismes de defensa estan codificats en la línia germinal, havent estat seleccionats al llarg de l'evolució. És una resposta ràpida, disponible en pocs segons o minuts i no requereix una exposició prèvia a l'agent que la desencadena. Tradicionalment, aquesta resposta no genera memòria immunològica, de manera que els desafiaments futurs tindran lloc de forma idèntica. Tanmateix, tot i que es troba present en els organismes més simples, els animals vertebrats utilitzen tres estratègies de reconeixement que permeten engegar o mantenir inactius els mecanismes immunitaris innats (2):

- **Reconeixement microbià aliè:** es basa en l'habilitat de l'hoste per reconèixer productes patogènics conservats del metabolisme microbià que són propis d'aquests microorganismes i no existeixen en l'hoste.
- **Auto-reconeixement:** es basa en la detecció de marcadors, productes gènics o de vies metabòliques úniques de l'hoste i absents en els microorganismes, que indiquen normalitat dels teixits propis. Aquest reconeixement està acoblat a diferents vies inhibidores que bloquegen el desencadenament de la resposta immunitària contra els teixits propis.

- **Reconeixement d'estructures pròpies alterades:** es basa en la detecció de marcadors d'alteracions en els teixits propis que s'indueixen després d'una infecció o una transformació cel·lular, assenyalant aquestes cèl·lules per a la seva eliminació per part del sistema immunitari.

L'expressió apropiada d'aquests indicadors permet discernir entre cèl·lules normals i sanes, cèl·lules anòmales o cèl·lules no pròpies i ignorar-les, fagocitar-les o atacar-les quan sigui necessari.

La immunitat innata ha sigut clàssicament classificada pel seu component cel·lular i el seu component humoral i junts engloben tota una sèrie de mecanismes on s'inclou una primera línia de defensa, composta per les barreres físiques, químiques i microbiològiques, però també elements com les cèl·lules que s'encarreguen d'aquest reconeixement i engugen conseqüentment la fagocitosi; el sistema de complement, les citocines i les proteïnes de fase aguda que desencadenaran el procés inflamatori.

El component cel·lular més immediat està compost per defenses locals, cèl·lules sentinella de l'epiteli de la pell i de les superfícies mucoses dels tractes respiratori, genitourinari i digestiu, i de l'endoteli. Així, les cèl·lules epitelials i endotelials són el primer obstacle per a l'entrada de microbis, no només proveint d'una barrera física (com les unions intercel·lulars estretes, la suor, la descamació, la producció de mucines o els moviments peristàltics i ciliars), també per participació activa a través de la producció de pèptids anti-microbians (com les defensines), enzims proteolítics (com el lisozim i la pepsina), citocines i quimiocines. Aquestes últimes mobilitzen les cèl·lules del sistema immunitari innat d'origen mieloide com els neutròfils, els basòfils, els eosinòfils, els mastòcits, els monòcits, els macròfags, i les cèl·lules dendrítiques (DCs, per les seves sigles en anglès), i les cèl·lules d'origen limfoide com les cèl·lules *natural killer* (NK) i cèl·lules limfoides de tipus innat (ILCs), que en cas de que els microbis travessin les barreres epitelials, engugen una resposta dirigida cap a la fagocitosi i/o eliminació del patogen i eliminació de les cèl·lules infectades.

Aquesta resposta immunitària innata per a l'eliminació de patògens o restes cel·lulars té característiques similars per als diferents tipus de patògens ja que és conduïda per un grup relativament petit de receptors no polimòrfics (2) expressats en la membrana de les cèl·lules fagocítiques (neutròfils, monòcits, macròfags i DCs) i de les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) (principalment DCs i macròfags), anomenats genèricament receptors de reconeixement de patrons (PRRs) que reconeixen **patrons moleculars associats al dany/mort derivats de l'hoste (DAMPs)**.

El reconeixement de DAMPs corresponents a molècules alliberades o exposades en les cèl·lules danyades o alterades, i/o en resposta a l'estrès cel·lular és un clar exemple del reconeixement d'estructures pròpies alterades. En aquest sentit, la **necrosi cel·lular** o el dany tissular és una font passiva de DAMPs, per alliberament del contingut intracel·lular com a conseqüència de la permeabilització i ruptura de la membrana plasmàtica, que desencadena una resposta inflamatòria i immunogènica dirigida a iniciar els processos de reparació tissular. Contràriament, el procés de mort cel·lular assistida, l'**apoptosi cel·lular**, engegat quan una cèl·lula és detectada com alterada o bé perquè esdevé independentment apoptòtica o senescent, es defineix com un procediment silent i no immunogènic, i està caracteritzat per la preservació de les estructures cel·lulars (bloquejant l'alliberament de DAMPs) i per l'expressió de senyals "*find-me*" i "*eat-me*" que incrementen la velocitat de fagocitosi dels cossos apoptòtics per part dels macròfags i bloquegen la reacció inflamatòria conseqüent. Un marcador de fagocitosi en les cèl·lules apoptòtiques que actua com a marcador distintiu respecte les cèl·lules sanes és l'exposició de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana (normalment no es troba exposada) que és reconeguda pel seu receptor corresponent i condueix a la fagocitosi cel·lular (3,4).

D'entre els tipus de DAMPs, també trobem estructures comunes compartides pels diferents tipus de patògens (sense especificitat d'antigen) que són absents en l'hoste, un clar exemple de reconeixement microbià aliè, els anomenats **patrons moleculars associats a patògens (PAMPs)** percebuts pel sistema immunitari innat com a signatures moleculars d'infecció.

El reconeixement de PAMPs i DAMPs pel mateix tipus de receptors, els PRRs, és una estratègia potent que uneix el programes intrínsecs de mort cel·lular amb les interaccions de les cèl·lules immunitàries per preservar la integritat cel·lular, l'homeòstasi i la supervivència, protegint l'organisme contra les infeccions i la transformació cel·lular (5) (Figura 1).

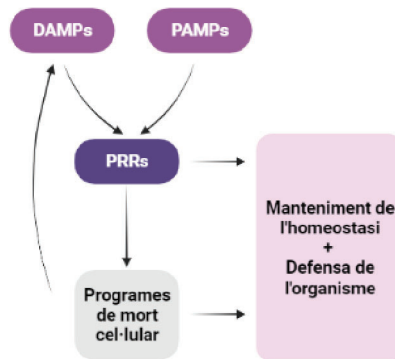


Figura 1. Estratègies de reconeixement en el sistema immunitari innat

Esquema representatiu del reconeixement de patrons moleculars associats al dany/mort derivats de l'hoste (DAMPs) i de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) per part dels receptors de reconeixement de patrons (PRRs) i les funcions que desencadenen.

Els PRRs es poden trobar expressats en la superfície cel·lular, en compartiments intracel·lulars o en forma soluble (secretats en la circulació i en els fluids tissulars) i poden captar aquestes senyals i alertar al sistema immunitari. Així, les funcions principals dels PRRs inclouen la producció de citocines pro-inflamatòries, l'activació del procés de fagocitosi, la inducció de la migració cel·lular, l'opsonització (recobriments de l'antigen, cèl·lules o microorganismes per facilitar el procés fagocític), l'activació del sistema de complement i de la cascada de la coagulació.

D'entre els diferents tipus de PRRs de superfície cel·lular i intracel·lulars, trobem els receptors de tipus *Toll* (TLRs), els receptors de tipus NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) (NLRs), receptors de tipus RIG (*retinoic acid-inducible gene 1*) (RLRs), els receptors de lectines de tipus C i receptors de tipus *scavenger* (3).

Els TLRs activen vies de senyalització que indueixen respostes efectores anti-microbianes i inflamació després del reconeixement de PAMPs. Addicionalment, l'activació dels TLRs expressats per les APCs, juga un paper crític en el desencadenament de la resposta immunitària adaptativa. Fins a la data, s'han descrit 10 tipus de TLRs en humans (TLR1-TLR10) i 12 murins (TLR1-9 i TLR11-13) (6). Tots els TLRs són proteïnes transmembrana de tipus I. El seu domini extracel·lular està compost per repeticions riques en leucina, necessàries pel reconeixement de PAMPs, seguit d'una regió transmembrana i un domini citosòlic implicat en la transducció de la senyal (7). Els TLRs són sintetitzats en el reticle endoplasmàtic i transportats cap a la membrana plasmàtica o al compartiment endosomal. Així, els TLRs localitzats en la membrana, estan especialitzats en detectar components de la superfície cel·lulars de microbis i són el TLR1, TLR2, i TLR6 (que reconeixen lipoproteïnes bacterianes), TLR4 (lipopolisacàrid (LPS)) i TLR5 (flagelina), mentre que els TLRs endosomals detecten àcids nucleïcs com el TLR3 (RNA de cadena doble (dsRNA)) TLR7 i TLR8 (RNA de cadena simple (ssRNA)) i TLR9 (DNA de cadena simple (ssDNA) no metil·lat, propi dels patògens) (8) (**Figura 2**). El TLR10, és un regulador negatiu de la senyalització dels altres TLRs i s'activa per reconeixement de dsRNA (9).

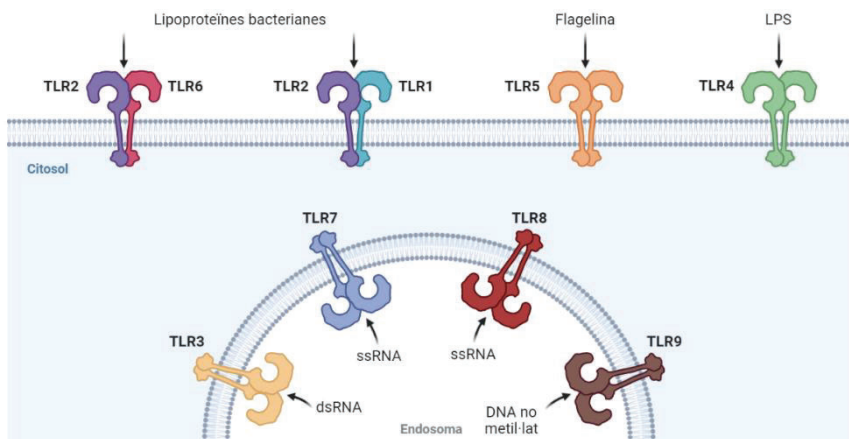


Figura 2. Localització i factors desencadenants de l'activació dels TLRs

El receptor de tipus *Toll* (TLR) 2 heterodimeritza amb TLR6 i TLR1 mentre que TLR5 i TLR4 formen homòdimers en la membrana quan es produeix el reconeixement estructures patogèniques extracel·lulars. Els TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 tenen localització endosomal i homodimeritzen en reconèixer estructures patogèniques intracel·lulars. LPS: lipopolisacàrid; dsRNA: RNA de cadena doble; ssRNA: RNA de cadena simple.

Introducció

El fet que els diferents tipus de TLRs reconeguin diferents lligands i interaccionin amb diferents proteïnes adaptadores proporciona major variabilitat en el tipus de resposta immunitària estimulada pels diversos productes microbians als que s'exposen. L'activació d'aquests receptors condueix a la seva dimerització i desencadena l'assemblatge d'una sèrie de proteïnes adaptadores citosòliques, conegudes com centre d'organització supramolecular (SMOC) que propaguen la senyal per l'activació de quinases. El TLR4 és únic entre els TLRs per la seva capacitat d'activar les dues vies de senyalització diferents, que en última instància, per la via de resposta primària de diferenciació mioide 88 (MyD88) o pel factor inductor de interferó β que conté el domini *toll* / IL-1R (TRIF), activa la transcripció de gens importants en la resposta inflamatòria com el factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres κ de les cèl·lules B activades (NF- κ B) i els factors reguladors dels interferons (IRFs) per a l'expressió de gens importants en la resposta inflamatòria que condueixen a la producció de citocines innates (com el factor de necrosi tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) i interleucina-6 (IL-6)), de quimiocines (com el lligand 2 de quimiocines de tipus CC (CCL2) o el lligand 8 de quimiocines de tipus CXC (CXCL8 o IL-8)), molècules d'adhesió endotelials i l'expressió de molècules co-estimuladores (com els *clústers* de diferenciació 80 i 86 (CD80 i CD86)) i per l'expressió dels gens que codifiquen per als interferons de tipus I (IFN I) (8) (**Figura 3**).

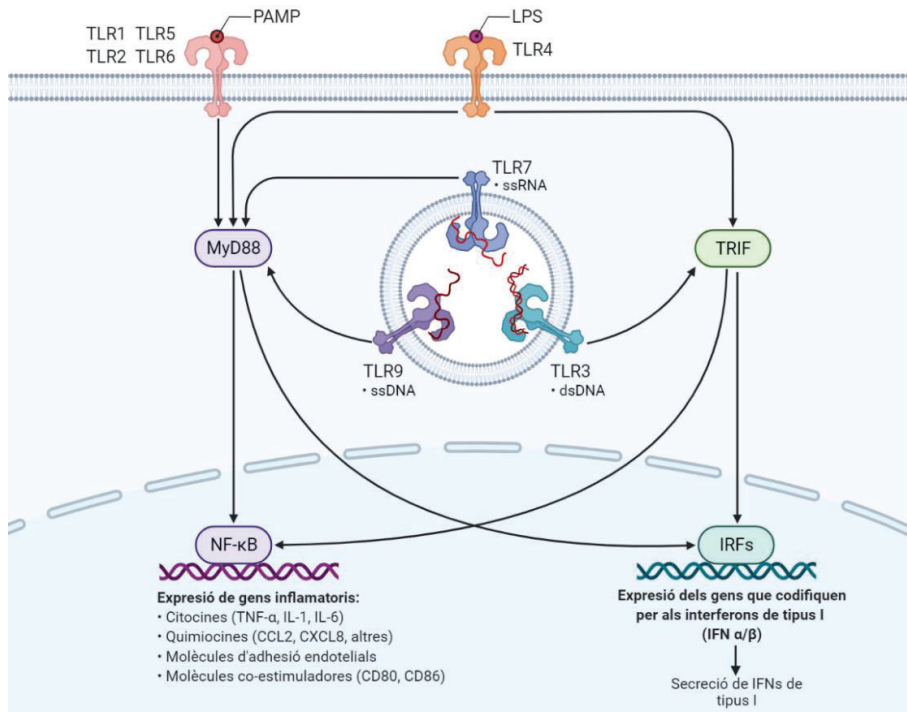


Figura 3. Vies de senyalització activades per TLRs

El reconeixement dels seus respectius lligands activa la senyalització de les vies mediades per MyD88 o TRIF, desencadenant la transcripció de gens que codifiquen per citocines inflamatòries, quimiocines, molècules d'adhesió, molècules co-estimuladores, i per la secreció d'interferons de tipus I, entre d'altres efectors, necessaris per armar la cèl·lula de l'hoste contra el patògen invasor.

Pel que fa al **component humoral** de la resposta immunitària innata, trobem les citocines i quimiocines, el sistema de contacte, els pèptids anti-microbians, els PRRs solubles i el sistema de complement (10).

- Les **citocines** són molècules produïdes per les cèl·lules immunitàries amb una funció de comunicació intercel·lular, interaccionant amb els seus receptors de superfície específics expressats en molts tipus cel·lulars. D'entre les citocines trobem les **quimiocines**, que reben el seu nom per les seves propietats quimiotàctiques (capacitat d'engegar el desplaçament de les cèl·lules immunitàries). Les citocines i quimiocines tenen una funció crucial en totes les fases de la resposta immunitària. Per exemple, les citocines esdevenen un estímul inicial pel reclutament de neutròfils des de la medul·la òssia i un cop alliberats a la

circulació s'adhereixen a les cèl·lules endotelials per expressió de molècules d'adhesió i es dirigeixen per quimiotaxi (mediada per quimiocines) cap als teixits inflamats, on reconeixeran l'agent patogènic, el fagocitaran i secretaran noves citocines amb funcions efectores en altres tipus cel·lulars.

- El **sistema de contacte** està compostat per components plasmàtics que activen la cascada de la coagulació conduint a la formació de coàguls, vasodilatació i permeabilitat vascular, quimiotaxi de neutròfils, activació del complement i modulació de la resposta adaptativa.
- Els **pèptids anti-microbians** actuen com a primera barrera química de defensa com hem comentat prèviament.
- Els **PRRs solubles** han estat proposats com els ancestres funcionals del anticossos (11) i comparteixen les funcions bàsiques amb els PRRs acorats a la membrana de les APCs en el reconeixement de molècules no pròpies o pròpies modificades. D'entre aquests PRRs secretats trobem les col·lectines (lectina d'unió a manosa (MBL)), ficolines i pentraxines (proteïna C reactiva (CRP) i la proteïna sèrica amiloide P (SAP)) i alguns components del sistema de complement, i són considerades proteïnes de fase aguda, és a dir, que són sintetitzades en el fetge durant les primeres etapes de la resposta inflamatòria (resposta de fase aguda), esdevenint marcadors d'infecció, inflamació i dany tissular. Generalitzant, aquests PRRs solubles presenten una àmplia capacitat de reconeixement de patògens i lligands intrínsecs, incloent cèl·lules apoptòtiques i components de la matriu extracel·lular, facilitant el seu aclariment per activació del sistema de complement, ja que actuen com opsonines, o per activació directa de les seves vies; o altres components de la resposta immunitària innata com els fagòcits a través de la interacció amb els receptors d'anticossos o immunoglobulines (Igs) de tipus G (IgG) (FcγRs) (12,13).
- El **sistema de complement** pot ser activat per tres vies diferents però totes convergeixen en la formació del complex d'atac a la membrana, un porus en la membrana cel·lular dels microbis o de les cèl·lules pròpies alterades que promou la seva lisi o el seu aclariment com detallarem a continuació.

1.1.1.1 El sistema de complement

El sistema de complement està conformat per més de 50 proteïnes sèriques solubles o associades a membrana que integren l'anomenada cascada del complement. Aquest sistema evolutivament conservat de la branca humoral de la immunitat innata ha sigut tradicionalment reconegut com un sistema de defensa contra patògens i infeccions, esdevenint un sistema sensor de PAMPs i DAMPs. Així, d'acord amb la seva concepció més clàssica proporciona una resposta efectora, a través l'opsonització o la lisi directa de les cèl·lules diana i pro-inflamatòria per la generació d'anafilotoxines, tot i que també se li han associat funcions importants en el manteniment homeostàtic per unió d'immunocomplexes (ICs) i cèl·lules apoptòtiques, assistint en la seva eliminació de la circulació i dels teixits danyats (14). La seva activació pot tenir lloc per tres vies principals:

- **Via clàssica:** s'indueix quan es produeix un reconeixement d'antigen per part d'un anticòs (formació d'ICs). En aquests casos, la regió Fc de les Igs de tipus M (IgM) o d'IgG s'uneix al component (C) 1q (C1q), que en condicions basals, forma un complex inactiu amb C1r i C1s, formant el complex C1. Després de la interacció amb ICs, C1q activa a C1r, que a la seva vegada escindeix i activa C1s. Això indueix l'escissió d'altres dos components, C2 i C4, donant lloc a la formació de C4bC2b, la C3 convertasa. Aquesta via també pot ser activada de forma independent d'Igs, per virus, bacteris Gram-negatius i altres molècules com la CRP, DNA o proteïnes plegades incorrectament.
- **Via alternativa:** es troba contínuament activada com a sistema de vigilància contra patògens. La hidròlisi espontània de C3 condueix a la formació de C3b, que s'uneix a les seves estructures diana. Després el Factor D escindeix el Factor B per formar Bb, assemblant la C3 convertasa, anomenada C3bBb, estabilitzada per la proteïna plasmàtica properdina, un regulador positiu secretat per neutròfils activats.
- **Via de les lectines:** es desencadena per la unió de MBL, ficolines, i/o col·lectina-11, als residus de manosa (carbohidrats) abundants en la superfície dels microorganismes. Això activa les serines proteases associades a MBL (MASP) 1 i

2. La MASP1 té capacitat per escindir C2 mentre que la MASP2 pot escindir C2 i C4, conduint a la formació de la C3 convertasa, C4bC2b.

Així, l'activació del complement té lloc de manera seqüencial. Les tres vies inicien la formació i activació dels enzims coneguts com C3 convertases (com hem comentant, C3bBb per a la via alternativa i C4bC2b per a la via clàssica i de les lectines). Totes dues, escindeixen el component central del complement C3 i generen el pèptid anafilàctic i anti-microbià C3a que recluta i activa les cèl·lules efectores del sistema immunitari innat i té activitat anti-microbiana i anti-fúngica; i la opsonina C3b, que pot ser dipositada sobre qualsevol superfície propera, cobrint la superfície de patògens o de cèl·lules apoptòtiques i les marca per a la seva fagocitosi degut a l'expressió de receptors específics dels productes de C3 expressats en les cèl·lules efectores. El dipòsit de C3b en cèl·lules pròpies s'evita per reguladors que bloquegen la progressió de la resposta, en un clar exemple de l'estratègia d'auto-reconeixement.

Aquesta activació continua amb la reacció d'amplificació que genera més C3 convertasa i diposita més C3b en la superfície concreta. Si l'activació progressa, es genera un nou enzim, la C5 convertasa, per la unió de C3b a les C3 convertases (C3bBbC3b per a la via alternativa i C4bC2bC3b per a la via clàssica i de les lectines). La C5 convertasa, escindeix C5, alliberant el potent pèptid anafilàctic C5a que actua com a quimioatracent de fagòcits cap al lloc d'inflamació; i genera C5b que inicia la via terminal, reclutant els components C6, C7, C8 i C9. L'assemblatge del complex C5b-C9, en forma de porus, sobre la membrana de les cèl·lules diana, té activitat citolítica i es coneix com complex d'atac a la membrana. D'aquesta manera, el sistema de complement activat genera múltiples components efectors que condueixen i orquestran les reaccions immunitàries posteriors.

1.1.1.1.1 Receptors del sistema de complement

Les funcions associades als diferents components del complement es duen a terme per unions dels fragments d'alguns components del complement a receptors específics expressats en la superfície d'alguns tipus cel·lulars (**Taula 1**). Revisat en (15,16).

Receptor	Lligand	Cèl·lules on s'expressa	Funcions
CR1 (CD35)	C3b, C4b, MBL, C1q	Eritròcits, limfòcits T i B cèl·lules fagocítiques (DCs i macròfags), neutròfils i podòcits	Aclariment d'ICs Fagocitosi Quimiotaxi Regulació de les convertases Facilita presentació antigènica en les cèl·lules B
CR2 (CD21)	iC3b, C3d, C3dg	Limfòcits B, fDCs, cèl·lules epitelials	Captació d'ICs en els CGs i conseqüent activació de cèl·lules B, inducció de tolerància en les cèl·lules B
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b	Cèl·lules fagocítiques (DCs i macròfags), neutròfils, eosinòfils, basòfils i fDCs	Fagocitosi i modulació de la producció de IL-12 per les APCs, ancoratge a l'endoteli i diapedesi
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b	Cèl·lules fagocítiques (DCs i macròfags), neutròfils, plaquetes i fDCs	Fagocitosi, ancoratge a l'endoteli i diapedesi
CRlg	C3b, iC3b	Cèl·lules fagocítiques (DCs i macròfags) i cèl·lules de Kupffer	Fagocitosi i regulació de les convertases
C3aR	C3a	Neutròfils, monòcits/macròfags, Mastòcits, monòcits, basòfils, cèl·lules endotelials i cèl·lules del múscul llis, DCs intestinals, macròfags i cèl·lules T activades	Desgranulació, quimiotaxi, augment de la permeabilitat vascular i contracció del múscul llis, regeneració tissular, increment de producció de IL-10 per les APCs
C5aR	C5a	Mastòcits, basòfils, cèl·lules endotelials i neutròfils, cèl·lules T	Quimiotaxi, generació de mediadors inflamatoris i comunicació amb FcR IgG, funció reguladora amb modulació de la producció de IL-12 per les APCs, activació de cèl·lules T
C1qR	C1q	Leucòcits, plaquetes	Aclariment d'ICs, fagocitosi

Taula 1. Receptors principals del sistema de complement i les seves funcions

CR: receptor del complement; CD: *clúster* de diferenciació, MBL: lectina d'unió a manosa; DCs: cèl·lules dendrítiques; fDCs: cèl·lules dendrítiques fol·liculars, APCs: cèl·lules presentadores d'antigen; ICs: immunocomplexes; IL: interleucina; CGs: centres germinals; FcRs: receptors per a la regió Fc de les immunoglobulines (Ig).

1.1.1.1.2 Regulació del sistema de complement

Una estimulació ineficient del sistema del complement pot conduir a una susceptibilitat incrementada a les infeccions bacterianes mentre que una sobre-estimulació més enllà de la superfície de patògens, considerant el seu caràcter potencialment destructiu, pot produir dany colateral en les cèl·lules sanes i ser perjudicial per a l'hoste, resultant en inflamació crònica i manifestacions autoimmunitàries. Així, aquesta cascada proteolítica es troba estretament regulada per inhibidors solubles i ancorats a la membrana que tenen com a diana diferents punts de la cascada del complement per

prevenir la seva activació no intencionada en les superfícies pròpies intactes (10,17,18).

Els inhibidors del sistema de complement poden ser **solubles** o estar **ancorats a la membrana** i actuen a diferents nivells de la cascada del complement. Hi ha quatre tipus principals d'inhibidors: el primer és una proteïnasa, l'inhibidor soluble de C1, que pertany a la família de les serpines i inhibeix directament el potencial proteolític de C1; el segon és la carboxipeptidasa sèrica N que inhibeix proteolíticament les anafilotoxines generades per C3 i C5 durant l'activació del complement; en tercer lloc trobem CD59 o protectina, un inhibidor ancorat a la membrana que actua sobre el complex d'atac a la membrana; i per últim, trobem un gran nombre d'inhibidors que actuen sobre les convertases C3 i C5, incrementant la dissociació d'aquests complexos enzimàtics (accelerant el seu decaïment) o promovent la degradació de C3b i C4b mediada per la serina proteasa Factor I (FI). D'entre aquest últim grup trobem la proteïna d'unió a C4b (C4BP) que és l'inhibidor soluble principal de la via clàssica i de les lectines, i que tractarem en profunditat al llarg d'aquesta tesi; i el Factor H, que inhibeix la via alternativa. D'entre els ancorats a membrana trobem el receptor 1 i 2 del complement (CR1 (CD35) i CR2 (CD21)), la proteïna cofactora de membrana (MCP (CD46)) i el factor accelerador del decaïment (DAF (CD55)) (19).

1.1.1.1.3 Funcions dels components i reguladors del sistema de complement

L'**activitat citolítica** més clàssica del sistema de complement s'exerceix per la formació del complex d'atac a la membrana (C5b-C9) sobre les membranes de bacteris i altres cèl·lules, engegant el seu potencial citotòxic. A més, l'alliberament d'**anafilotoxines** C3a i C5a exerceix una potent activació sobre cèl·lules immunitàries que alliberen mediadors de la inflamació i substàncies vasoactives que incrementen la permeabilitat dels capil·lars, facilitant l'afluència de leucòcits al focus inflamatori. Per tant, d'acord amb la concepció clàssica del sistema de complement, aquest desencadena accions protectores que resulten pro-inflamatòries induint l'activació del sistema immunitari adaptatiu a diferents nivells.

Malgrat això també se li han atribuït funcions importants en el manteniment de la integritat dels teixits i els òrgans amb una activitat d'**opsonització** per part de C3b per facilitar el procés fagocític, així com en la solubilització d'ICs, que de ser dipositats en els teixits activarien la cascada inflamatòria. Per contra, l'opsonització amb C3b i la presència del seu receptor CR1 en la membrana dels eritròcits, permet la seva captació i en travessar el fetge o la melsa induir la fagocitosi per part dels macròfags que uneixen aquests ICs a través de CR1, CR3 o CR4. La funció de les opsonines també permet eliminar de forma eficient les cèl·lules alterades o mortes, actuant com a sensors en el reconeixement d'estructures pròpies alterades. En aquest sentit, C1q i MBL, ambdós iniciadors de la cascada del complement, opsonitzen *blebs* i cèl·lules apoptòtiques i a la vegada s'uneixen a calreticulina, expressada en la superfície dels fagòcits. Aquesta proteïna no presenta domini transmembrana però proporciona senyalització per a la ingestió de la cèl·lula apoptòtica a través la proteïna relacionada amb el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LRP) (també coneguda com CD91) iniciant així, l'aclariment d'aquestes cèl·lules apoptòtiques (20). Tanmateix, altres opsonines com C3b i els seus fragments produïts per l'escissió que realitza el FI, com iC3b, C3c i C3d, que clàssicament han tingut una funció pro-inflamatòria en l'opsonització dels patògens i en la mediació de la fagocitosi a través dels seus receptors en les DCs i els macròfags (CR1, CR2, CR3 i CR4 (veure **Taula 1**) o del receptor per al complement de la família de les immunoglobulines CR1g), també presenten una activitat que contribueix a l'homeòstasi i la regeneració en aquest aclariment de cèl·lules apoptòtiques (17,21–23).

Aquesta funció auxiliar per millorar o assistir en el paper dels anticossos o el fagòcits en l'aclariment de patògens o cèl·lules danyades, implica una important comunicació entre el complement i el sistema fagocític mononuclear (24) exercint una **activitat reguladora de la resposta immunitària** que tractarem en profunditat en la **secció 1.3**. Totes aquestes funcions es troben representades en la **figura 4**.

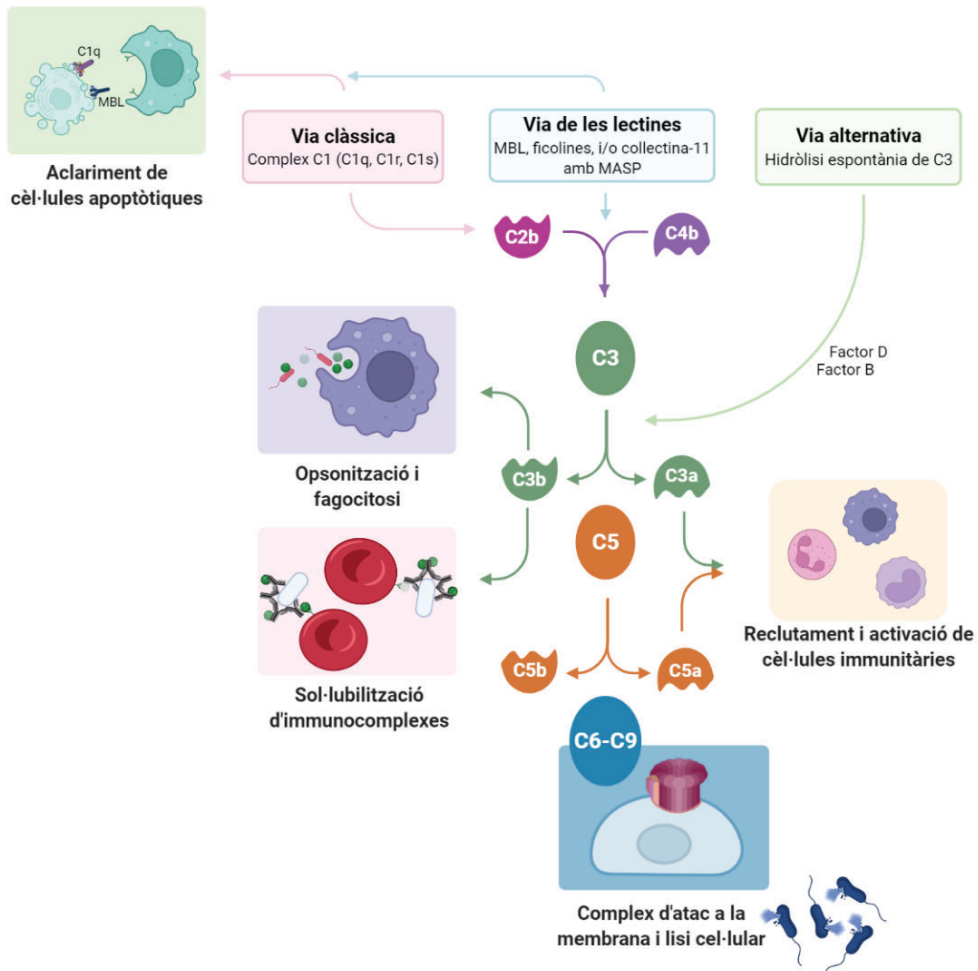


Figura 4. Visió general de les vies d'activació del sistema de complement amb les seves funcions

La cascada del complement pot ser iniciada a través de la via clàssica, de les lectines o la via alternativa que resulten en la formació de la C3 convertasa que s'escindeix i s'activa alliberant C3b i C3a. La subseqüent activació de C5, amb la formació de C5b i els components C6 fins a C9 resulten en la formació del complex d'atac a la membrana, i l'alliberament de C5a. Tanmateix estan indicades les funcions descrites dels components del complement en els diferents nivells d'actuació. C: component del complement; MBL: lectina d'unió a manosa; MASP: serina proteasa associada a MBL.

En els últims anys, a més, s'han descrit nous mecanismes de producció i activació de components del complement. Així, addicionalment a la modulació paracrina que exerceixen els components del complement de síntesi hepàtica, hi ha evidències de l'existència d'un sistema de complement intracel·lular, que s'ha anomenat **complosoma** (25–27) sintetitzat i secretat localment per cèl·lules residents en els teixits, cèl·lules immunitàries com les DCs (28) i les cèl·lules T (29), amb efecte paracrí i autocrí, que a més de proveir de defensa immunitària (protecció davant la invasió per patògens intracel·lulars, secreció de C3 com a sensor de DAMPs i opsonització), intervé directament en la supervivència i diferenciació de cèl·lules, i regula el metabolisme cel·lular, impactant en els aspectes més fisiològics (30).

1.1.1.2 La resposta de fase aguda

La resposta de fase aguda és la reacció immune-inflamatòria inicial no específica que es genera per un procés de dany tissular o contra una infecció, involucrant alteracions sistèmiques fisiològiques i metabòliques amb l'objectiu final de recuperar l'homeòstasi, participant en la defensa de l'hoste i en la reparació o regeneració el teixit danyat.

Aquesta resposta és engegada quan els patògens arriben a la circulació, un cop superades les barreres més innates, i són reconeguts pels PRRs de les cèl·lules del sistema fagocític mononuclear (monòcits, DCs i macròfags) que capten el dany imminent, o la presència de cèl·lules amb estrès o infectades i promouen una resposta local pro-inflamatòria, i desencadenen, en paral·lel a l'arribada de la resposta immunitària cel·lular (actuant com APCs), una resposta conduïda àmpliament pel component humoral, amb la secreció de citocines pro-inflamatòries innates com IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α i IFN- γ . Aquests mediadors clau, viatgen a través de la circulació, induint canvis neuroendocrins i de comportament (febre, hiponatrèmia, somnolència i letargia), i arriben al fetge, on els hepatòcits, amb capacitat d'actuar com agents immunològics, tenen un paper central en la resposta immunitària innata sistèmica a través de la secreció intravascular de proteïnes de fase aguda (31).

Les proteïnes de fase aguda conformen un conjunt de fins 40 proteïnes diferents, però d'entre les que incrementen la seva concentració en sèrum (proteïnes de fase aguda

positives) en resposta a la inflamació trobem els PRRs solubles abans esmentats CRP i SAP, i d'altres com la proteïna sèrica amiloide A (SAA), la proteïna d'unió a LPS, components del complement, l' α -1-glicoproteïna àcida, factors d'hemostàsia com fibrinogen, plasminogen, protrombina i activadors del plasminogen, i proteïnes d'unió i transport com l'haptoglobina i anti-proteases (32).

Aquestes proteïnes participen en la defensa de l'hoste, com ara en l'atracció de cèl·lules inflamatòries, inactivació d'enzims proteolítics, activació del complement, opsonització i aclariment d'agents infecciosos i limiten el dany tissular eliminant els radicals lliures i modulant la resposta immunitària en l'hoste. Així, la generació d'aquesta resposta inflamatòria regulada és el primer mecanisme de defensa fisiològic evolutivament conservat, contra una agressió física, química o biològica, o una amenaça interna com l'estrès metabòlic. Aquest procés complex i coordinat es desencadena amb l'objectiu final de restituir l'homeòstasi i reparar/regenerar el teixit danyat en un període relativament curt de temps (33). Contràriament, si el dany persisteix es produeix una resposta inflamatòria crònica associada amb un gran nombre de patologies com el processos autoimmunitaris i les malalties vasculares.

El desencadenament inicial de la resposta de fase aguda, junt amb la interacció bidireccional entre tots els components de la branca humoral i cel·lular que hem revisat, com les proteïnes del complement, els TLRs o els fagòcits, són essencials en el manteniment de l'homeòstasi tissular, actuant com a sensors i reparant els teixits danyats, o eliminant de forma silent de cèl·lules senescentes o apoptòtiques així com en la detecció i eliminació de patògens instruint, quan és necessari, la resposta immunitària adaptativa.

1.1.2 El sistema immunitari adaptatiu

Després d'engegar la primera línia de defensa per lluitar contra agents desafiants exògens o endògens, intervé una segona línia de defensa, la resposta immunitària adaptativa. Aquesta resposta, també anomenada adquirida o específica, només es troba present en vertebrats i es configura durant dies o setmanes després de l'exposició al patògen. Té com a diana estructures específiques, pel que depèn de

receptors que són dissenyats i seleccionats per un procés de recombinació somàtica, generant una resposta molt específica i flexible. A més, aquest tipus de resposta genera memòria immunològica, pel que en les futures trobades amb el mateix patogen la resposta esdevindrà de forma més ràpida i millor, quantitativa i qualitativament.

El sistema immunitari adaptatiu està format per un **component cel·lular** que inclou els efectors de la resposta, els limfòcits T i les cèl·lules productores d'anticossos, els limfòcits B. La presència d'un receptor específic en els limfòcits per un antigen en concret, implica una gran diversitat de receptors capaços de reconèixer una àmplia varietat d'antígens. Seguidament, després del reconeixement antigènic, els limfòcits T i B presenten una expansió clonal, una proliferació selectiva i especialitzada (34).

Els **limfòcits T** s'originen a partir dels precursors limfoides de la medul·la òssia que migren al timus, on té lloc a la seva maduració. En primer lloc, aquestes cèl·lules T esdevenen doble positives $CD4^+CD8^+$ i llavors es produeix l'expressió dels gens importants en l'assemblatge del receptor de la cèl·lula T (TCR) esdevenint cèl·lules $CD3^+CD4^+CD8^+$. Un cop que aquest receptor es forma, tenen lloc els fenòmens de tolerància central, on s'eliminen els limfòcits T que no reconeixen els pèptids propis carregats en les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC) (es seleccionen el que si reconeixen MHC de forma apropiada; selecció positiva) i també s'eliminen els que reconeixen pèptids propis carregats en MHC amb alta avidesa (selecció negativa), assegurant que els limfòcits T auto-reactius no maduren. Així, les cèl·lules T seleccionades són les que uneixen, mitjançant el TCR, els MHC carregats de pèptids propis amb baixa avidesa, presentats per les cèl·lules epitelials, DCs i macròfags del timus. Tanmateix, si el TCR ha reconegut MHC de classe I, esdevenen limfòcits T $CD8^+$ mentre que els seleccionats per MHC de classe II adquireixen un fenotip $CD4^+$. Ambdós tipus abandonen el timus i entren en la circulació com cèl·lules T madures (34).

Els **limfòcits T $CD8^+$** o **citotòxics** interaccionen amb els pèptids presentats en MHC de classe I de qualsevol cèl·lula nucleada, generats a partir de proteïnes produïdes intracel·lularment (antígens endògens). Són limfòcits citolítics que marquen les

cèl·lules per contacte directe, activant la mort per apoptosi de la cèl·lula diana, com en el cas de cèl·lules transformades o infectades per virus.

Els **limfòcits T CD4⁺** estan designats amb el nom de cèl·lules T *helper* (Th) o col·laboradores. Són un component central en l'orquestració de la resposta immunitària adaptativa i executen les seves funcions en els teixits perifèrics i diferents òrgans limfoides. Per ser activats necessiten tres senyals que reben per part de les APCs (concretament, per les DCs): la primera és la interacció **TCR amb l'antigen presentat en MHC de classe II**; la segona, la senyal de **co-estimulació**, com CD80/CD86 expressat en les DCs amb CD28 expressat en els limfòcits Th i per últim les **citocines**, secretades segons la naturalesa del desencadenant. D'aquesta manera, la senyalització del TCR i els factors extrínsecs com les citocines polaritzaran la diferenciació d'aquestes cèl·lules cap als diferents subtipus segons l'activació dels diferents transductors de senyals i activadors de la transcripció (STATs) que induiran uns subtipus de factors de transcripció específics, dotant aquestes cèl·lules d'una gran plasticitat i heterogeneïtat, i condicionant el destí final per inducció de l'expressió de gens específics del llinatge i co-activadors, i a la seva vegada, per repressió de l'expressió de gens associats amb els llinatges alternatius (35,36). Aquestes cèl·lules, tot i que ara veurem les seves funcions específiques de subtipus, en general proporcionen defensa a l'hoste a través de la producció de citocines efectores que activaran altres cèl·lules immunitàries com macròfags o cèl·lules T CD8⁺ en l'eliminació de cèl·lules infectades i ajudaran a les cèl·lules B en la producció d'anticossos.

- **Limfòcits Th1:** es diferencien sota la influència de IL-12 i IFN- γ . La producció d'IL-12 per part de les APCs activa el factor de transcripció STAT4, i l'IFN- γ produït per les NKs o les cèl·lules T activen STAT1. Ambdós, indueixen l'expressió del factor de transcripció T-bet que promou la producció de IFN- γ , característic d'aquesta resposta, que activa i estimula altres cèl·lules immunitàries com cèl·lules T CD8⁺, cèl·lules NK, ILC1s i macròfags M1, mitjançant la resposta immunitària per patògens intracel·lulars com micobacteris o virus (37).
- **Limfòcits Th2:** es diferencien sota la influència d'IL-4 que activa STAT6 induint l'expressió del factor de transcripció GATA3. Aquest tipus de resposta induïda per

hipersensibilitat i patògens extracel·lulars, com paràsits, condueix a la producció d'IL-4, que estimula la producció d'anticossos i promou el canvi d'isotip cap a IgE en les cèl·lules B i activa macròfags M2; IL-5 que recluta eosinòfils als llocs d'inflamació i IL-13 que estimula la producció de mucines i la hiperplàsia de les cèl·lules de Goblet en el manteniment de l'homeòstasi de la mucosa intestinal (37).

- **Limfòcits Th17:** es diferencien sota la influència d'IL-6 i IL-21 en conjunt amb el factor de creixement transformant β (TGF- β) i activen STAT3 i el factor de transcripció clau receptor γ t orfe relacionat amb el receptor d'àcid retinoic (ROR- γ t) i produeixen IL-17 i IL-22. Aquestes citocines activen les cèl·lules immunitàries i les cèl·lules epitelials que conformen les barreres intestinals, de la pell i els pulmons per produir metal·loproteases (MMP), òxid nítric, citocines i pèptids antimicrobians per aclarir patògens extracel·lulars com bacteris i fongs. Com s'evidencia per les seves funcions, aquestes cèl·lules presenten un rol dual; d'una banda, secreten citocines pro-inflamatòries com TNF- α i IL-17 i d'altra, citocines que protegeixen l'epiteli com IL-10 i IL-22. L'activació excessiva però, fa que esdevinguin patogèniques. De fet, IL-17 és una potent citocina pro-inflamatòria que indueix la producció de citocines innates com IL-6 i TNF- α , induint un reclutament de neutròfils constant cap als llocs de inflamació i afavorint el procés de dany tissular, i té molta importància, com veurem, en autoimmunitat.
- **Limfòcits Th9:** es diferencien sota la influència d'IL-4 i TGF- β que activen el factor de transcripció *SFFV proviral Integration 1* (PU.1) i produeixen IL-9, involucrada en l'eliminació de paràsits per activació de mastòcits i eosinòfils. Aquesta citocina també indueix la secreció de mucines en les barreres epitelials i la infiltració neutrofílica durant les reaccions al·lèrgiques.
- **Limfòcits Th22:** es diferencien sota la influència de TNF- α i IL-6, que engegen les vies de senyalització de Notch, activant el factor de transcripció *aryl hydrocarbon receptor* (AHR). Aquests limfòcits secreten principalment citocines que protegeixen la barrera intestinal, com IL-10, amb propietats immunosupressores, i IL-22 que estimula la proliferació de les cèl·lules epitelials i la síntesi de mucines, contribuint a mantenir la integritat de la barrera epitelial i la seva reparació, i

incrementant la immunitat innata de la mucosa contra les infeccions bacterianes i fúngiques (38).

- **Limfòcits Th fol·liculars (Thf):** la seva diferenciació s'inicia en la zona de cèl·lules T dels fol·licles limfoides dels nòduls limfàtics i la melsa on les DCs (que en els fol·licles s'especialitzen com a DCs fol·liculars, fDCs) activen les cèl·lules T CD4⁺ naïve per presentació antigènica (TCR amb MHC de classe II), senyals de co-estimulació (co-estimulador induïble de cèl·lules T (ICOS) i el seu lligand (ICOSL)) i producció d'IL-6 que activa el seu factor de transcripció proteïna 6 del limfoma de cèl·lules B (Bcl-6), esdevenint cèl·lules T especialitzades que expressen el receptor 5 de quimiocines del tipus CXC (CXCR5), induint la seva migració cap a la frontera entre les cèl·lules T i B, on després d'interaccionar amb la cèl·lula B, incrementant encara més l'expressió de CXCR5 continuaran la seva migració a la zona de cèl·lules B, contribuint a la formació dels centres germinals (CGs). En els CGs les cèl·lules Thf expressen el lligand de CD40 (CD40L) i proporcionen co-estimulació a les cèl·lules B per interacció amb el CD40 expressat en la seva superfície, necessari per a la formació de cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos d'alta afinitat, i produeixen IL-21 que controla el manteniment, proliferació i maduració de l'afinitat antigènica òptima de les respostes als CGs.
- **Limfòcits T reguladors (Treg):** es diferencien sota la influència d'IL-2 i TGF- β que promouen l'expressió de Foxp3 per activació d'STAT5 i SMAD2/3 respectivament. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per ser CD4⁺CD25⁺ on el CD25 correspon a la cadena α del receptor per a IL-2. Són productores d'IL-10 i TGF- β , que regulen les respostes immunitàries cap al manteniment de l'homeòstasi i el seu restabliment, un cop l'amenaça és neutralitzada pel sistema immunitari. Tanmateix, les cèl·lules Treg asseguren un estat d'immunotolerància contra components propis inhibint l'activació, proliferació i producció de citocines per part de les cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺, cèl·lules B i DCs, pel que són molt importants en els processos autoimmunitaris. A l'intestí, la presència d'àcid retinoic i d'altres metabòlits produïts per la microbiota, inhibeix la polarització a Th17 i promou la generació de limfòcits Treg, importants en el manteniment de tolerància cap a la microbiota intestinal.

Els **limfòcits B** sorgeixen a partir dels precursors limfoides en la medul·la òssia i en adquirir un estat immadur, caracteritzat per l'expressió d'IgM en la membrana, que no reconeix auto-antígens, surten de la medul·la òssia i completen el seu desenvolupament cap a un estat madur, caracteritzat per l'aparició de IgD junt amb IgM en la superfície cel·lular (39). Aquestes cèl·lules madures de la perifèria poden ser activades per l'antigen mitjançant el receptor específic de la cèl·lula B (BCR) que activa la senyalització i allibera l'antigen als components intracel·lulars on és degradat i retornat a la membrana unit a molècules MHC de classe II, esdevenint tant actives com les APCs en la presentació antigènica. En la frontera entre les cèl·lules B i T dels fol·licles dels òrgans limfoides secundaris, aquests complexos podran ser reconeguts per cèl·lules Thf (que han rebut prèviament co-estimulació i activació front el mateix patògen per part de les APCs com s'ha esmentat anteriorment) que, en una comunicació bidireccional amb la cèl·lula B, induiran diferents possibles destinacions sobre aquesta cèl·lula (40). D'una banda, les cèl·lules B podran esdevenir directament cèl·lules plasmàtiques extrafol·liculars de vida curta, secretores d'anticossos de baixa afinitat, o bé podran continuar en els fol·licles per establir els CGs. En els CGs, les Thf induiran la seva proliferació i diferenciació, i mitjançant els fenòmens de re-ordenament gènic per al canvi isotípic i segons l'ambient de citocines es produirà el canvi d'IgM i IgD per isotips com IgG, IgA i IgE, resultant en una producció d'anticossos amb més afinitat per l'antigen. Aquests clons sortiran dels CGs i es diferenciaran en cèl·lules B de memòria o en cèl·lules plasmàtiques de vida llarga contribuint a la resposta ràpida i robusta davant la re-exposició als antígens.

Així, el **component humoral** de la immunitat adaptativa està mediat per aquests anticossos produïts per les cèl·lules B sota senyals rebudes pes les cèl·lules Th i les DCs així com l'estimulació per part de les citocines en els òrgans limfoides secundaris.

Les IgG mostren gran afinitat cap als antígens i l'habilitat d'activar el sistema de complement per unió de C1q i també són responsables de la memòria immunològica. Per unió als seus receptors, FcγR, IgG elimina els microorganismes i influencia la migració i maduració de les cèl·lules immunitàries, afectant a la síntesi de mediadors inflamatoris. Aquests FcγRs són glicoproteïnes expressades en la superfície de les

cèl·lules immunitàries i poden actuar com a activadors (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA i FcγRIIIB) o inhibidors (FcγRIIB) de la resposta immunitària (41). Els FcγRs uneixen principalment IgG però també poden unir SAP o CRP. Particularment, la relació entre CRP i FcγRIIA causa la internalització d'autoantígens, microorganismes i cèl·lules danyades (42). A través d'aquests receptors, els antígens en complex amb IgG i les proteïnes del complement unides poden ser reconeguts per macròfags especialitzats, DCs i les cèl·lules B, que també presenten aquests receptors per a Fc d'IgG i pel fragment C3d del complement, reconeguts per CR2 en complex amb CD19 en la cèl·lula B. De fet, el reconeixement d'aquests complexos per CR2 provoca una activació més eficient de la resposta en les cèl·lules B i una potent producció d'anticossos. Les fDCs també presenten FcγRs i receptors per a aquests components del sistema de complement, i la unió d'aquests en la seva membrana també pot desencadenar l'activació indirecta de cèl·lules B.

Tanmateix, alguns antígens microbians poden activar les cèl·lules B directament en absència de cèl·lules Th, proveint d'una resposta directa i ràpida contra bacteris via BCR o TLRs que també s'expressen en la seva superfície cel·lular (39). Malgrat això, els fenòmens d'hipermutació somàtica que produeixen una maduració de l'afinitat i certs canvis d'isotip depenen de la interacció de les cèl·lules B activades amb les cèl·lules Th i DCs en els òrgans limfoides perifèrics, pel que la resposta induïda per aquests antígens de forma independent de les cèl·lules Th és menys selectiva i específica.

Segons la funció de les cèl·lules B, aquestes es poden dividir en cèl·lules B efectores, que secreten anticossos i citocines com IL-2, IL-4, IFN- γ , TGF- β i factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF); i **cèl·lules B reguladores (Breg)**, una subpoblació de cèl·lules B supressores, generalment desencadenades per un estímul pro-inflamatori, que contribueixen a la tolerogènesi per producció d'IL-10, TGF- β i IL-35. Específicament, aquestes cèl·lules poden inhibir la diferenciació de cèl·lules Th1, Th17, Thf i de cèl·lules B, estimular l'anergia clonal de cèl·lules T i l'expansió de cèl·lules Treg (43,44).

1.2 Les APCs: nexa entre la immunitat innata i la immunitat adaptativa

La resposta protectora de l'organisme contra patògens i cèl·lules alterades depèn de la correcta activació de la immunitat innata i la immunitat adaptativa. Com hem anat veient, en el centre dels dos components de la immunitat és on resideixen les APCs més especialitzades, on s'engloben les DCs i els macròfags, i que junt amb els monòcits, conformen el sistema fagocític mononuclear.

1.2.1 Ontogènia

D'acord amb el seu origen hematopoètic les cèl·lules de sistema fagocític mononuclear deriven dels progenitors comuns de monòcits i DCs (MDPs), que donen lloc a progenitors de DCs (CDPs) i progenitors de monòcits (cMoPs). Els CDPs que surten de la medul·la òssia deriven en cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDCs) i pre-DCs, que donaran lloc a les cèl·lules dendrítiques convencionals (cDCs), que anomenarem simplement DCs, desenvolupant les seves funcions sentinella en els teixits (**Figura 5**) (45). En paral·lel, els cMoPs donaran lloc als monòcits en la medul·la òssia i l'expressió del receptor de quimiocines CXCR4 provocarà la seva egressió des de la medul·la òssia cap a la circulació.

Posteriorment, el reclutament d'aquests monòcits clàssics (CD14⁺⁺CD16⁻ en humans; Ly6C^{high} en ratolins) cap als teixits és modulada per l'eix que involucra el receptor 2 de quimiocines de tipus CC (CCR2) amb els seus lligands CCL2/CCL7 (46). En condicions homeostàtiques, després de que els monòcits travessin l'endoteli, adquireixen capacitats per avaluar l'entorn per a la presència d'antígens, incrementant l'expressió de MHC de classe II, molècules co-estimuladores i del receptor de quimiocines CCR7, que si s'escau, media el transport cap als nòduls limfàtics per a la presentació antigènica a les cèl·lules T. Malgrat això, en estat estacionari, els monòcits que entren en els teixits, limfoides i no limfoides, no es diferencien de forma contínua cap a macròfags ni a DCs i per tant, acaben abandonant els teixits a través dels vasos limfàtics o esdevenen apoptòtics i són aclarits. Així, tot i que els monòcits són els precursors del macròfags tissulars, sembla que aquesta diferenciació té lloc durant

l'embriogènesi, i posteriorment aquestes poblacions de macròfags es mantenen per auto-renovació més que per reposició de monòcits circulants en la vida adulta (47).

Contràriament, durant la resposta de fase aguda les citocines pro-inflamatòries activaran i mobilitzaran els cMoPs cap a la circulació, on es diferenciaran a monòcits que migraran a través de l'endoteli activat i un cop reclutats en els teixits es diferenciaran a macròfags (macròfags derivats de monòcits; Mo-macròfags) i DCs (DCs derivades de monòcits; Mo-DCs) que exerciran una resposta immunitària pro-inflamatòria potent amb producció d'IL-1 β i TNF- α , i caracteritzada per les seves funcions fagocítiques i el seu rol com a APCs (48). De fet, per depleció de les poblacions cel·lulars residents en els teixits s'ha vist que els precursors de monòcits circulants en la sang poden reemplaçar funcionalment els macròfags i DCs especialitzades (49), el que reforça el concepte de monòcits sanguinis com a reservoris d'aquests tipus cel·lulars, particularment en els processos inflamatoris on s'incrementa el seu reclutament.

Quan la progressió de la resposta immune-inflamatòria no s'atura, l'acció prolongada dels monòcits clàssics inflamatoris pot resultar en dany en el teixit i conduir cap a l'autoimmunitat (50). Però en condicions normals, dies després del dany inicial, la inflamació aguda entra en fase de resolució, i els nivells de monòcits clàssics es redueixen i són reemplaçats progressivament cap a monòcits intermedis (CD14⁺CD16⁺) i no-clàssics (CD14⁺CD16⁺⁺ en humans; Ly6C^{low} en ratolins), que en resposta a l'eix CX3CR1-CX3CL1 poden acumular-se en el teixit danyat i, posteriorment diferenciar-se a DCs i macròfags secretors de citocines anti-inflamatòries (IL-10, TGF- β) que contraresten el dany tissular i promouen la reparació (51).

1.2.2 Macròfags

D'acord amb el que acabem de veure, durant tot el procés inflamatori, les citocines secretades són responsables de la diferenciació dels macròfags i defineixen el seu mode d'activació, establint una divisió en macròfags clàssicament activats (M1) o alternativament activats (M2). Els macròfags M1 presenten funcions pro-inflamatòries

i una activitat antibacteriana significativa. Aquests són activats per exposició a IFN- γ , GM-CSF o LPS i quan són estimulats secreten grans quantitats de citocines (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-18, IL-23), quimiocines (CXCL9, CXCL10), espècies reactives d'oxigen i de nitrogen. Aquests presenten un paper rellevant en la resposta immunitària conduïda per cèl·lules Th1 i Th17. Per contra, els macròfags M2 són induïts per IL-4, IL-10 i IL-13 i exhibeixen funcions anti-inflamatòries en la fase de resolució, en la reparació tissular i fibrosi, regulant l'activació de les cèl·lules Th2 i promovent la diferenciació de Treg a través de la secreció de IL-10 i TGF- β (52). A través d'aquests mecanismes, els macròfags activen **localment** la resposta immunitària adaptativa.

1.2.3 Cèl·lules dendrítiques

1.2.3.1 Subtipus

Les DCs són un grup de cèl·lules immunitàries innates àmpliament heterogeni en quant a les seves propietats fenotípiques i funcionals. Com hem vist, d'acord amb el seu origen hematopoètic, les DCs deriven d'un precursor CDP de la medul·la òssia i en els òrgans perifèrics es desenvolupen en diferents subtipus amb diferent ontogènia, propietats immunològiques i rols específics (**Figura 5**), definint la seva **plasticitat innata**:

- **DCs clàssiques o convencionals** de tipus 1 (cDC1) (BDCA3⁺) i de tipus 2 (cDC2) (CD1c (BDCA1)⁺) que tenen capacitat de presentar antígen als limfòcits T CD8⁺ i regulen principalment, però no de forma exclusiva, les respostes immunitàries de tipus Th1 i Th2, respectivament.
- **DCs plasmacitoides** (pDCs): secreten grans quantitats d'INF de tipus I en resposta a infeccions víriques, poden presentar antígen i morfològicament són més similars a les cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos.

Com hem vist, en condicions inflammatòries però, els monòcits clàssics circulants esdevenen, quan arriben als teixits, una font de DCs, les Mo-DCs. Aquestes DCs inflammatòries juguen un rol rellevant en el curs de les malalties inflammatòries i autoimmunitàries. Tanmateix, són el model més àmpliament estudiat de DCs, ja que poden ser obtingues *in vitro*, degut a la seva fàcil adquisició en grans quantitats a

través de la seva diferenciació amb GM-CSF i IL-4, a partir de monòcits CD14⁺ de sang perifèrica (53). Alternativament, en aquest model, la presència exclusiva de GM-CSF facilita la diferenciació dels monòcits cap a macròfags (Mo-macròfags no activats/polaritzats (M0)). Els anàlisis transcriptòmics han mostrat que les Mo-DCs generades *in vitro* i les DCs inflamatòries aïllades dels fluids humans comparteixen signatura gènica, suggerint que les DCs inflamatòries humanes *in vivo* serien equivalents amb les Mo-DCs obtingudes *in vitro* (54), de manera similar a les DCs inflamatòries murines i les DCs derivades de progenitors de la medul·la òssia murines (BM-DCs) obtingudes a partir dels monòcits de la medul·la òssia (55); permetent un estudi mecanístic exhaustiu sobre el seu paper en els processos immune-inflamatoris a nivell molecular i l'enfocament terapèutic amb DCs en l'àmbit clínic.

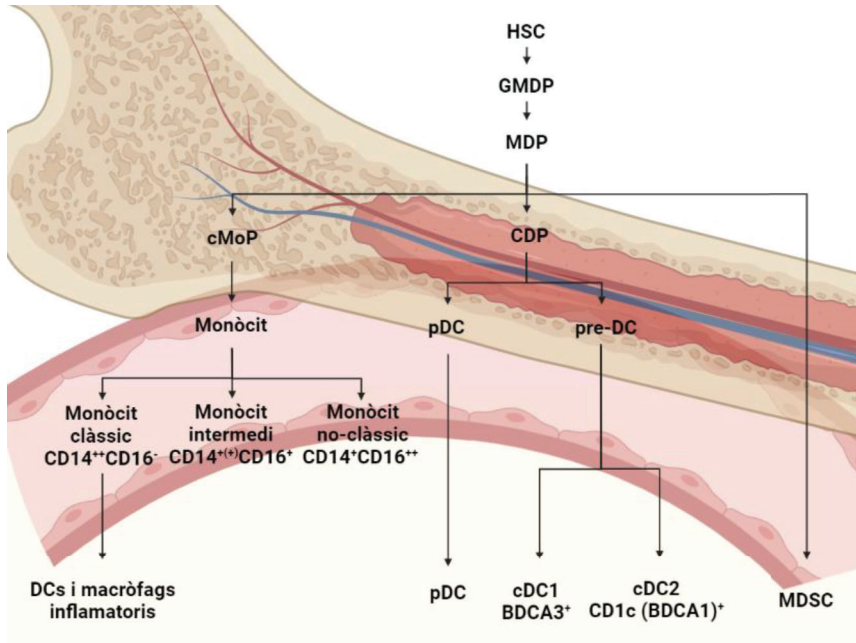


Figura 5. Ontogènia i diferenciació dels diferents subtipus de DCs presents en els teixits

Les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC) en la medul·la òssia donen lloc als progenitors de granulòcits, monòcits i DCs (GMDPs) que esdevenen progenitors de monòcits i DCs (MDPs). Els progenitors de cèl·lules dendrítiques (CDPs) es diferencien en cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDCs) i en els precursors de cèl·lules dendrítiques (pre-DCs) que passaran a la circulació i arribaran als teixits perifèrics on aquests últims esdevindran cèl·lules dendrítiques convencionals de tipus 1 i 2 (cDCs1 i cDCs2). En paral·lel, el precursor MDP també dona lloc als precursors comuns de monòcits (cMoPs) que un cop en la circulació esdevindran monòcits clàssics (en condicions inflamatòries seran reclutats cap als teixits i originaran DCs inflamatòries), monòcits intermedis i monòcits no-clàssics. D'aquesta branca MDP també sorgirà una població de cèl·lules supressores d'origen mieloide (MDSCs) caracteritzades per la seva activitat tolerogènica en els teixits.

1.2.3.2 Plasticitat funcional de les DCs: immunogenicitat i tolerància

Les DCs estan dotades d'una gran plasticitat per adaptar de forma efectiva la seva resposta davant de tota una sèrie d'estímuls ambientals, amb capacitat de realitzar funcions completament oposades i jugant un paper clau en totes les fases de la inflamació.

Així, en el sentit immunogènic, les DCs localitzades arreu del teixits dels cos, estan proveïdes d'una capacitat particular d'actuar com a sensors en la percepció inicial de substàncies potencialment nocives no-pròpies o pròpies alterades, a través del reconeixement de DAMPs i PAMPs *in situ*. Així, les DCs immadures (iDCs) que resideixen en els teixits perifèrics en condicions estàtiques, analitzen l'ambient per a la presència d'alteracions i un cop activats el seus PRRs (com els TLRs), determinen l'origen de l'antigen i acoblen els pèptids antigènics resultants del processament en els MHC de classe II. Influenciades per les quimiocines, amb l'expressió incrementada de CCR7 migren a través dels canals limfàtics, experimentant tota una sèrie de transformacions bioquímiques i morfològiques que condueixen a la seva "maduració" o activació, esdevenint DCs madures (mDCs) (56). Aquests canvis inclouen la disminució de l'expressió del receptor de manosa (un cop capturat i endocitat l'antigen), l'increment de l'expressió de les molècules MHC de classe II (on es presentaran els pèptids antigènics resultants del processament intracel·lular), l'expressió incrementada de marcadors d'activació com CD83 i de molècules coestimuladores com CD80, CD86 (regulada pel factor de transcripció NF- κ B) i CD40, i una secreció incrementada de citocines. Un cop arriben als òrgans limfoides secundaris es posicionen estratègicament dins dels nòduls limfàtics on presenten els antigens processats als limfòcits T *naïve* i indueixen la seva activació (57) (**Figura 6**).

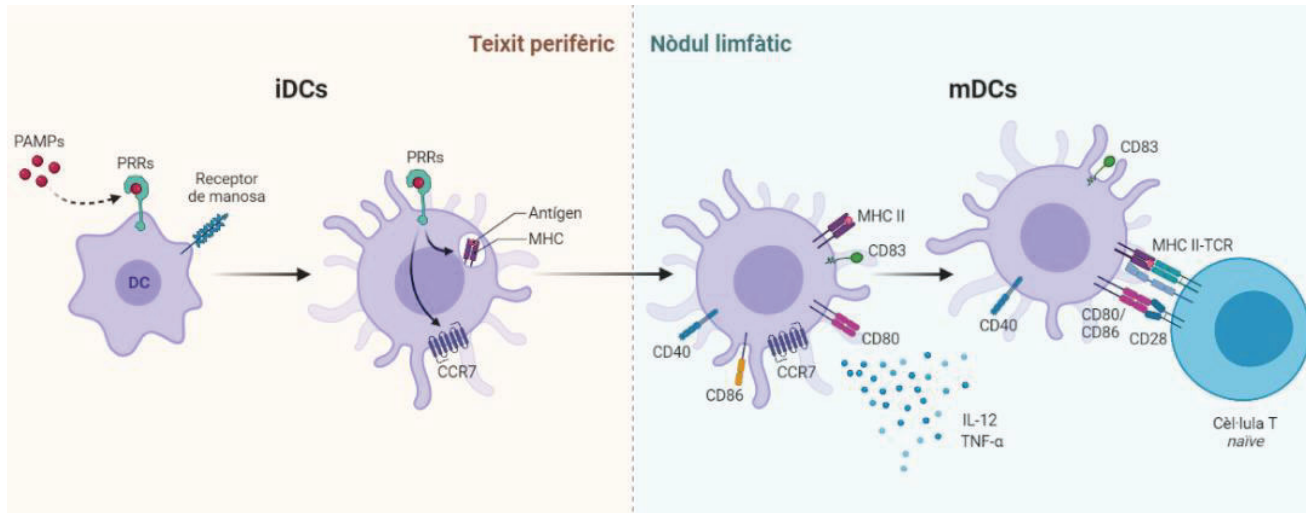


Figura 6. Característiques fenotípiques i funcionals de les DCs durant el seu procés d'activació i maduració

Les cèl·lules dendrítiques immadures (iDCs) reconeixen els patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) i disminueixen l'expressió del receptor de manosa que endocita l'antigen. La senyalització per part dels receptors de reconeixement de patrons (PRRs) induïx l'activació de les iDCs i comença el processament antigènic que condueix a l'expressió dels pèptids derivats en associació amb les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC) de tipus II en la membrana. Tanmateix s'indueix l'expressió del receptor de quimiocines CCR7, que conduirà les DCs activades cap als nòduls limfàtics durant el seu procés de maduració, amb els canvis fenotípics i funcionals associats. Finalment, en els nòduls limfàtics les DCs madures (mDCs) presentaran els pèptids antigènics a les cèl·lules T *naïve*.

Curiosament, s'ha mostrat recentment que les pDCs, les cDCs i les Mo-DCs realitzen una reprogramació genètica convergent durant la seva maduració, que condueix a l'expressió de fenotips similars (58). D'aquesta manera, instrueixen als limfòcits T *naïve* per interacció amb el TCR d'especificitat i afinitat òptima. A la seva vegada, proveeixen de les senyals addicionals, per expressió de molècules co-estimuladores en la superfície cel·lular i per secreció de citocines, necessàries per l'activació de les cèl·lules T *naïve*, induint també la seva pròpia maduració cap a APCs potents. L'activació de les cèl·lules T, que esdevindran diferenciades i específiques, indueix la secreció de tot un set de citocines secundàries per dur a terme la resposta efectora apropiada i activar subseqüentment els limfòcits B específics d'antigen.

Aquesta maduració de les DCs es pot assolir *in vitro* mitjançant tota una sèrie de mediadors pro-inflamatoris o immunogènics com agonistes de TLRs (LPS, gardiquimod), citocines (TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-12), lligands co-estimuladors (CD40L), i alguns químics o compostos biològics que provoquen la maduració de les Mo-DCs, conduint-les cap a un fenotip immunogènic, caracteritzat per nivells incrementats de MHC de classe II i de molècules co-estimuladores, una capacitat de captura antigènica reduïda però presentació antigènica incrementada que desencadena la resposta i diferenciació de les cèl·lules T *naïve* i una secreció incrementada de citocines pro-inflamatòries (IL-12, TNF- α , INF- γ , IL-6, entre d'altres), en concordança amb les seves característiques *in vivo*.

Les DCs però, no només són indispensables per a la coordinació de la resposta immunitària contra una amenaça, també són necessàries per regular el sistema immunitari en l'estat estàtic i per induir immunotolerància, determinant la seva **plasticitat adquirida**. De fet, en absència d'estímul pro-inflamatori o per activació de determinats immunoreceptors inhibidors (lligand de la proteïna de mort cel·lular programada (PD-L) 1 i 2, B7-H3, transcrit de tipus immunoglobulina 3 (ILT3)) i d'altres receptors que contenen motius inhibidors basats en tirosina, les DCs es mantenen en un estat immadur. En aquest estat, les DCs adquireixen un rol de no-resposta o tolerant en els òrgans limfoides centrals o en la perifèria. D'acord amb aquest perfil inductor de tolerància, les DCs estan caracteritzades per una gran capacitat de captació

antigènica, processament i presentació però una baixa expressió de molècules co-estimuladores, clau per exercir la seva funció en els processos de selecció negativa de la tolerància central, en la depleció de cèl·lules T auto-reactives durant el desenvolupament dels limfòcits T en el timus. Malgrat això, aquest procés és insuficient per eliminar els clons auto-reactius de forma completa. Mecanismes addicionals de tolerància perifèrica ajuden a mantenir l'homeòstasi immunitària i eviten les reaccions contra antigens propis o inofensius. De nou, les DCs residents en els teixits limfoides i particularment, les que migren pel sistema limfàtic són clau en aquest procés. Aquestes DCs poden promoure la tolerància perifèrica de cèl·lules T auto-reactives per mantenir l'homeòstasi immunològica a través de dos mecanismes:

- **Deleció clonal de cèl·lules T efectores auto-reactives** per inducció de vies d'apoptosi, a través de l'activació de vies com el receptor Fas, que incrementa la seva expressió en les cèl·lules T durant la seva activació i que pot unir el seu lligand FasL expressat en les DCs i induir l'apoptosi (59) o a través de la interacció entre el lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb TNF (TRAIL) de les DCs amb els receptors de mort de les cèl·lules T (60) o a través de l'expressió d'indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO; un enzim que metabolitza el triptòfan) que pot bloquejar el cicle cel·lular en les cèl·lules T i induir la seva apoptosi (61).
- **Anergia de cèl·lules T efectores** per absència de co-estimulació, com per exemple quan les cèl·lules T reconeixen un antigen presentat per les DCs a través de la interacció entre el TCR i MHC, sense interacció de CD28 amb CD80/86, incapacitant la producció de IL-2 per part de les cèl·lules T i per tant, la seva proliferació (62). Tanmateix, l'expressió de molècules co-inhibidores en les DCs propaga la senyalització inhibidora en les cèl·lules T, reprimint la seva proliferació i promovent aquest estat d'hipo-resposta que manté les cèl·lules inactives, com l'expressió de PD-L1 en les DCs i la unió amb el seu receptor PD-1 en les cèl·lules T (63) o la inducció de cèl·lules T amb elevada expressió de la proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics (CTLA-4) que en unió amb CD80 i CD86 en les DCs promou la transendocitosi i degradació d'aquestes molècules co-estimuladores (64).

Aquests tipus de DCs, amb un patró de secreció de citocines anti-inflamatori (IL-10, TGF- β) desencadenen la inducció de la diferenciació cap a cèl·lules Treg. En aquest sentit, la captació de cèl·lules apoptòtiques, per part d'aquestes DCs de característiques tolerogèniques permet la continuació d'aquest nivell de tolerància, resistent a la seva maduració i la inducció de cèl·lules Treg. Tanmateix, aquestes DCs també són capaces d'induir cèl·lules Breg en el context de malalties autoimmunitàries (65).

Donada la inestabilitat fenotípica intrínseca de les iDCs, que malgrat tenir propietats tolerogèniques poden adquirir característiques immunogèniques sota condicions pro-inflamatòries, i la dificultat d'aïllar subpoblacions poc freqüents de mDCs amb característiques tolerogèniques, s'han desenvolupat diversos protocols per a la generació de DCs en estat de tolerància *in vitro*. Molècules endògenes i sintètiques com hormones (vitamina D3), neuropèptids (pèptid intestinal vasoactiu), immunosupressors (dexametasona, rapamicina, ciclosporina, tacrolimus), citocines i factors de creixement (IL-10, TGF- β) o fàrmacs (aspirina, àcid retinoic) entre d'altres, promouen propietats tolerogèniques en Mo-DCs humanes generades a partir de monòcits que, mimetitzant les circumstàncies *in vivo*, estan caracteritzades essencialment per una expressió reduïda de MHC de classe II i de les molècules superficials co-estimuladores (CD80, CD86 i CD40) i els marcadors d'activació (CD83) i per una expressió incrementada de receptors i lligands inhibidors (PD-L1, PD-L2, ILT3, FasL, TRAIL i IDO), en concordança amb les característiques inductores de tolerància central i perifèrica que es produeixen *in vivo* i que hem descrit prèviament. A la vegada, a més d'aquests mecanismes característics del contacte directe cèl·lula-cèl·lula, aquestes Mo-DCs tolerogèniques presenten una producció reduïda o nul·la de citocines pro-inflamatòries (IL-12, TNF- α , IFN- γ i IL-8) i, contràriament, una producció incrementada de citocines anti-inflamatòries (IL-10 i TGF- β), inclús en presència d'inflamació. Aquest estat de no-resposta induït pel bloqueig de les vies clau d'activació i maduració com la via pro-inflamatòria NF- κ B, permet suportar també la diferenciació i el manteniment de cèl·lules Treg i prevenir la polarització i proliferació de les cèl·lules Th, atenuant la resposta adaptativa.

Aquestes accions reguladores o tolerogèniques de les DCs *in vivo*, crucials per mantenir o reprendre l'homeòstasi immunològica i per prevenir les respostes autoimmunitàries, està determinada pel seu estat d'activació/maduració. Per aquest motiu les iDCs i les mDCs han estat clàssicament associades amb un fenotip tolerogènic i immunogènic respectivament, tot i que la relació entre la maduració de les DCs i l'adquisició d'un fenotip immunogènic no sempre està clar. En ratolins, en condicions fisiològiques, s'ha reportat una maduració de iDCs cap a mDCs amb característiques tolerogèniques (66) i en humans, aquest tipus de DCs també es troben entre la població heterogènia de cèl·lules supressores d'origen mieloide (MDSCs) (67) (**Figura 5**). Així, els estudis suggereixen que aquest fenotip també pot ser adquirit per una via de maduració de les DCs divergent on, depenent de l'estímul específic, poden diferenciar-se cap a aquest fenotip semi-madur típicament tolerogènic.

1.3 Generació de tolerància immunològica induïda per proteïnes de fase aguda i proteïnes del sistema de complement

Les proteïnes de fase aguda han sigut tradicionalment explorades com a biomarcadors diagnòstic/pronòstic que reflecteixen la presència i intensitat de la inflamació durant la infecció o el dany. Malgrat això, tot i que la majoria de les proteïnes de fase aguda, com hem vist prèviament, han sigut tradicionalment considerades com pro-inflamatòries, per exemple, pel reclutament de cèl·lules immunitàries per l'aclariment eficient de patògens; els estudis recents suggereixen que, en funció del microambient i a través de mecanismes moleculars que encara no es coneixen completament, són capaces d'interaccionar directament amb els fagòcits mononuclears induint un fenotip regulador en aquestes cèl·lules. De fet, hi ha evidències que mostren que les proteïnes de fase aguda poden influenciar directament la diferenciació de les DCs cap a un estat tolerogènic (revisat en (68)).

Quan es produeix un estat de sèpsia, s'indueix aquesta resposta sistèmica inflamatòria que, en paral·lel, comporta l'aparició en la circulació dels subtipus de monòcits intermedis i no-clàssics (69). Una part important d'aquests monòcits induïts no

generen la població prototípica de DCs inflamatòries (CD1a⁺), diferenciant-se preferentment cap a DCs alternatives (CD1a⁻) que presenten una menor producció de IL-12p70 i una capacitat reduïda d'induir Th1, mentre que incrementen la inducció de Treg, en comparació amb les poblacions de monòcits en individus sans on predominen els monòcits clàssics (70). D'altra banda, en ratolins deficients pel component del receptor de la senyalització compartit per a les citocines de la família IL-6 (gp130), que són les principals inductores de la síntesi de proteïnes de fase aguda en el fetge; l'administració de SAA i CXCL1/KC promou la mobilització i acumulació de MDSCs, revertint l'estat inflamatori i restablint la supervivència d'aquests ratolins quan experimenten una sèpsia polimicrobiana (71), destacant l'estreta relació entre els hepatòcits i les cèl·lules immunitàries innates durant la resposta de fase aguda en la regulació de la resposta inflamatòria i en el manteniment homeostàtic mitjançant el reclutament i promovent la funció de les MDSCs.

D'acord amb aquestes dades, les proteïnes de fase aguda, actuen sistèmica i localment en una finestra de temps estreta i restringida junt amb l'increment del reclutament de monòcits cap al focus inflamatori, per aturar les conseqüències perjudicials de la sobre-inflamació, redirigint la diferenciació d'aquests monòcits cap a DCs amb característiques reguladores o tolerogèniques, en un intent de recuperar l'homeòstasi i instaurar de nou la integritat tissular amb la resolució de la resposta immune-inflamatòria.

D'entre les proteïnes de fase aguda, els PRRs solubles, actuant directament en les etapes inicials de la diferenciació de monòcits (mediada per GM-CSF i IL-4 en el model de generació de DCs inflamatòries *in vitro*), són capaços de conferir un fenotip i funcions tolerogèniques a les Mo-DCs resultants. En aquesta línia, diferents estudis han mostrat que les pentraxines, com la CRP i la SAP, afegides al cultiu de monòcits CD14⁺ durant les etapes inicials de diferenciació cap a Mo-DCs indueixen un fenotip típicament tolerogènic (72,73), en el cas de la CRP per unió a l'immunoreceptor FcγRII, que al llarg de la diferenciació disminueix la seva expressió i en el cas de la SAP, per una unió forta amb els monòcits que es debilita durant la diferenciació, el que evidencia la finestra estricta de la inducció de tolerogènesi. Dins d'aquesta mateixa família, la

pentraxina 3 (PTX3), incrementa la fagocitosi de forma dependent del receptor FcγRII, unint cèl·lules apoptòtiques a la vegada que recluta la proteïna C4BP per limitar l'activació del complement (74) i una resposta inflamatòria exacerbada. En aquest context, PTX3 redueix l'alliberament de TNF-α per part de les Mo-DCs estimulades amb LPS, i indueix la secreció de citocines anti-inflamatòries, i inhibeix la sobre-expressió de CD86, *human leukocyte antigen* (HLA)-ABC i HLA-DR en la superfície cel·lular (75). Altres proteïnes de fase aguda com la SAA, la α1-antitripsina i el fibrinogen i les proteïnes d'unió a hemoglobina i ferro com la ferritina, la lactoferrina i l'haptoglobina i també han mostrat induir aquestes característiques sobre les Mo-DCs.

Tanmateix, en funció del microambient, alguns components del sistema de complement, de forma directa o indirecta, tenen la capacitat d'influenciar la diferenciació i/o funció de diferents subtipus de DCs cap a la immunogenicitat o la tolerància amb l'objectiu d'aconseguir un balanç en la inflamació quan es produeix la detecció de DAMPs, revisat en (76), evidenciant l'existència d'una varietat de funcions no canòniques d'alguns efectors i moduladors del sistema de complement.

En aquest sentit, MBL, que també és un reactant de fase aguda, influencia les primeres etapes de la diferenciació de Mo-DCs, possiblement a través de membres de la família STAT, caracteritzant les Mo-DCs resultants amb una expressió de MHC de classe II, CD80 i CD40 baixa, secreció incrementada d'IL-10 i reducció de l'auto-proliferació de cèl·lules T (77), i influencia el fenotip i la funció de les DCs estimulades per a la seva maduració, per atenuació de la unió del LPS a les iDCs, disminuint producció de citocines pro-inflamatòries (IL-12, TNF-α) i l'auto-proliferació de cèl·lules T (78).

Hi ha altres components del complement no descrits com a proteïnes de fase aguda, com C1q que mostra unió a CRP, SAP i PTX3 i ha estat proposada com a marcador de DCs tolerogèniques perquè rellevants agents immunomoduladors com dexametasona, IL-10 o vitamina D3 són capaços d'induir una sobre-expressió de 10 vegades C1q a nivell de RNA missatger (mRNA) i de proteïna en Mo-DCs (79). Tanmateix, el tractament amb C1q disminueix l'expressió dels marcadors de maduració en les Mo-DCs, mantenint-les en un estat immadur i tolerant, actuant en un

període de temps estret durant la diferenciació (80) i suprimeix la producció de IL-12 induïda per TLR4 mitjançant l'activació de la via PI3K (81). A més, per interacció amb l'immunoreceptor de tipus immunoglobulina associat a leucòcits 1 (LAIR-1) amb CD33, inhibeix la diferenciació de monòcits a Mo-DCs (82,83). A més, C1q unida a limfòcits en fase tardana d'apoptosi ha mostrat induir un efecte sobre les Mo-DCs caracteritzat per una expressió de CD86 reduïda i una menor estimulació de la proliferació dels limfòcits Th1 i Th17 autòlegs i al·logènics, amb una tendència a incrementar la proliferació de Treg respecte les Mo-DCs que fagociten limfòcits en fase tardana d'apoptosi sense C1q (84). D'altra banda, les iDCs presenten la seva pròpia producció de C1q que sembla desaparèixer quan es produeix la seva maduració (85). També s'evidencia una producció incrementada d'IL-12p40 en ratolins C1q^{-/-} respecte els *wild type* i l'administració de C1q sobre BM-DCs evita la producció d'IL-12p40 condicionada per l'administració de LPS (86).

Altres components com les anafilotoxines C3a i C5a, així com les opsonines C3b, iC3b, C3dg i C4b; també presenten activitats immunomoduladores condicionades pel context, actuant sobre les cèl·lules immunitàries a diferents nivells. C3a i C5a interaccionen amb els seus receptors en els fagòcits i, tot i que està descrit que fomenten l'activació cel·lular, la capacitat al·loestimuladora i la producció de citocines pro-inflamatòries (87), també indueixen els efectes oposats, inhibint la producció d'IL-12, IL-23 i TNF- α en Mo-DCs (88). En quant a les opsonines, l'aclariment de cèl·lules apoptòtiques opsonitzades amb iC3b indueix el manteniment de les DCs en un estat immadur (21) i la interacció de C3b amb CR3 inhibeix la diferenciació de les Mo-DCs, la producció d'IL-12 i la proliferació de les cèl·lules T al·logèniques, a través de la senyalització per la via de la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK) (89) i estimula la producció d'IL-10 i TGF- β (90). iC3b també presenta un paper rellevant en el procés de diferenciació de les MDSCs (91). Una deficiència en C4 constitueix, com veurem, un factor de risc en la susceptibilitat al lupus eritematós sistèmic (LES) i aquests pacients presenten unes concentracions sèriques de C4 disminuïdes (92). En concordança, C4 administrada *in vitro*, indueix en els co-cultius de DCs i cèl·lules T, la diferenciació cap a Treg, amb un increment de la producció de TGF- β que reflexa la funció i estabilització de les Treg per part de les DCs (93).

Els reguladors del sistema de complement, C4BP i Factor H també han mostrat, per interacció directa amb Mo-DCs un potencial anti-inflamatori i inductor de tolerogènesi (94,95). De forma anàloga a una de les isoformes de C4BP que a més, també és una proteïna de fase aguda, com comentarem àmpliament a continuació, el Factor H també indueix un fenotip tolerogènic en Mo-DCs, a través de receptor(s) encara desconegut(s), actuant en les primeres fases de la diferenciació de monòcits a DCs, caracteritzat per una expressió disminuïda del marcador de maduració CD83 i de les molècules co-estimuladores CD80, CD86 i CD40, una disminució de la producció de citocines Th1 (IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6, i IL-8), amb uns nivells anàlegs als de les iDC, i producció de mediadors immunomoduladors (IL-10 i TGF- β). A més, aquestes Mo-DCs mostren una baixa expressió de CCR7 i de capacitat quimiotàctica, així com d'estimulació de l'auto-proliferació de cèl·lules T i una inhibició de la producció d'IFN- γ induït, contràriament la diferenciació de Treg (95).

Així, d'entre tota la quantitat de senyals de l'ambient que les DCs poden captar, la connexió de les DCs amb les proteïnes de fase aguda i del sistema de complement resulta una alternativa emergent per induir intrínsecament un fenotip immunomodulador capaç de regular la resposta immunitària.

1.3.1 Proteïna d'unió a C4b (C4BP)

Com hem vist a l'inici d'aquesta introducció, el sistema de complement és un sistema efector essencial en la defensa innata contra patògens comuns que es troba controlat rigorosament per múltiples proteïnes reguladores, ja que la seva activació inapropiada pot resultar en inflamació i destrucció dels teixits de l'hoste (18).

C4BP és l'inhibidor soluble principal les vies d'activació del complement clàssica i de les lectines. Aquesta glicoproteïna de 570 kilodaltons (kDa) és sintetitzada principalment en el fetge i es troba en la circulació amb una concentració plasmàtica estimada de 200 mg/L. La seva estructura defineix principalment l'existència de dues isoformes diferents: C4BP(β +) i C4BP(β -) amb funcions comunes i d'altres que són específiques de cada isoforma.

1.3.1.1 Estructura de C4BP

Aquesta proteïna pertany a la família gènica de reguladors de l'activació del complement (RCA), junt amb altres reguladors de les vies d'activació del sistema de complement associats a membrana com CR1, CR2, MCP i DAF i alguns solubles, com el Factor H.

Tots els components d'aquesta família estan estructuralment formats per mòduls o dominis anomenats *complement control protein* (CCP), també coneguts com *short consensus repeats* (SCRs) o dominis sushi (96). Aquests dominis CCP estan formats per ~ 60 aminoàcids, són rics en cisteïna i es repeteixen en forma de tàndem formant una estructura lineal (97).

D'acord amb això, la cadena α de C4BP (75 kDa) està composta per 549 aminoàcids i els 491 aminoàcids N-terminal es poden dividir en vuit CCPs (**Figura 7**). La seqüència en el seu extrem C-terminal presenta una regió sense repeticions de 57 aminoàcids que conté dos residus de cisteïna i una regió d'hèlix α amfipàtica. Aquesta regió és necessària i suficient per la formació d'interaccions proteïna-proteïna entre les extensions C-terminal de les cadenes α que condueixen a l'oligomerització de C4BP, mentre que les dues cisteïnes són importants per l'estabilització de l'oligòmer amb la formació de ponts disulfur però no pel procés d'oligomerització (98).



Figura 7. Representació estructural de la cadena α de C4BP

La cadena α està formada per 8 dominis CCP ancorats a un domini d'oligomerització pel seu extrem C-terminal. DO: domini d'oligomerització; CCP: *complement control protein*.

La cadena β (40 kDa) consisteix en 235 aminoàcids i conté tres CCPs, i la regió C-terminal, d'uns 60 aminoàcids sense repeticions amb dos residus de cisteïna, similar a la seva estructura corresponent en la cadena α , també està implicada en l'oligomerització de les subunitats (**Figura 8**), tot i que la cadena β no es requereix per l'oligomerització de les cadenes α i quan s'expressa sola queda retinguda en les

cèl·lules i es degrada (98,99) Tanmateix, en el seu extrem N-terminal presenta un lloc d'unió per a la proteïna S anticoagulant dependent de vitamina K (PS) (100).

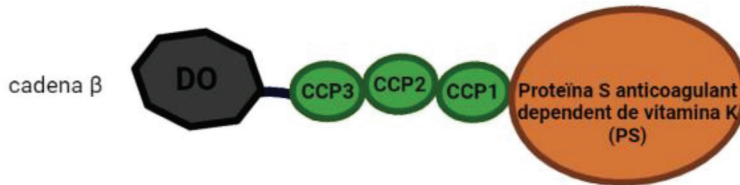


Figura 8. Representació estructural de la cadena β de C4BP

La cadena β està formada per 3 dominis CCP ancorats a un domini d'oligomerització pel seu extrem C-terminal i la unió a proteïna S anticoagulant dependent de vitamina K (PS) pel seu extrem N-terminal. DO: domini d'oligomerització; CCP: *complement control protein*.

Aquestes cadenes α i β es troben estretament unides pel seu extrem C-terminal configurant el domini d'oligomerització central que determina el seu alineament espacial formant una estructura de tipus aranya (101). Aquesta estructura és adoptada per les isoformes de C4BP presents en la circulació. Així, C4BP es troba majoritàriament en forma hetero-oligomèrica, composta per set cadenes α i una cadena β , anomenada C4BP(α 7 β 1) o C4BP(β +) i una isoforma minoritària homo-oligomèrica que preserva les set cadenes α però no presenta cadena β , anomenada C4BP(α 7 β 0) o C4BP(β -) (Figura 9).

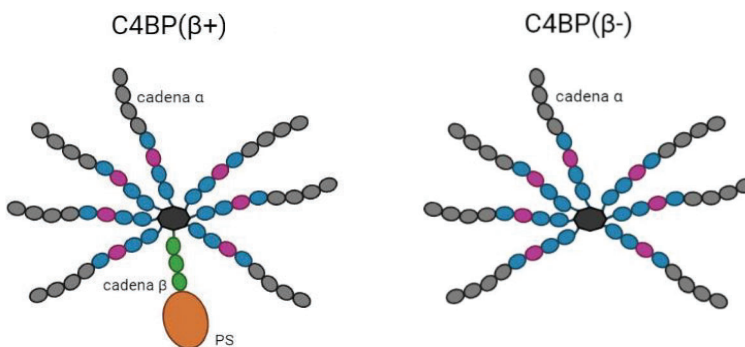


Figura 9. Representació estructural de les proteïnes C4BP(β +) i C4BP(β -)

A l'esquerra C4BP(β +) es troba composta per 7 cadenes α amb 8 CCPs cadascuna i una cadena β amb 3 CCPs unida a la proteïna S anticoagulant dependent de vitamina K (PS). Totes les cadenes es troben unides a un domini d'oligomerització central. A la dreta, C4BP(β -) es troba composta exclusivament per 7 cadenes α amb 8 CCPs cadascuna unides al domini d'oligomerització central.

D'acord amb aquesta estructura, totes les molècules de C4BP que contenen cadena β (C4BP(β^+)) circulen en plasma formant un complex amb PS (C4BP(β^+)-PS), mentre que la isoforma C4BP(β^-) no uneix PS (102).

La proteïna C4BP murina està composta per set cadenes α de forma homòloga a C4BP humana, en aquest cas però cada cadena α només presenta 6 dominis CCP degut a que la proteïna C4BP murina no presenta els dominis CCP5 ni CCP6. Les diferents cadenes α oligomeritzen per unions no-covalents ja que els extrems C-terminals no contenen els residus de cisteïna que estableixen els ponts disulfur (103). A més, en ratolins el polipèptid que conforma la cadena β s'ha perdut o ha esdevingut no funcional (104). Malgrat aquestes diferències, presenta un 61% d'homologia amb C4BP humana i controla d'igual manera l'activació de la cascada del complement.

1.3.1.2 Biosíntesi i regulació de C4BP

Els gens que codifiquen per a les cadenes α i β de C4BP es troben localitzats en el clúster de gens RCA que codifiquen per a aquestes proteïnes reguladores de l'activació del complement, tots situats en una regió propera, dins del braç llarg del cromosoma 1 (105). Les cadenes α i β estan codificades pels gens *C4BPA* i *C4BPB* respectivament, expressats principalment en el fetge (104). D'acord amb això, C4BP es sintetitza i oligomeritza de forma ràpida en el reticle endoplasmàtic dels hepatòcits (19) i la subunitat β no és necessària per al procés d'oligomerització (99). Tanmateix, tot i que C4BP és sintetitzada en el fetge presenta llocs de síntesi secundària, com ara els monòcits.

D'acord amb el seu nivell d'expressió, C4BP està classificada com un reactant de fase aguda perquè els seus nivells s'eleven fins a quatre vegades en plasma durant el procés inflamatori agut i després d'un trauma, mentre que en malalties inflamatòries cròniques esdevé sobre-expressada d'entre un 30 a un 50% (106,107). Curiosament, sota aquestes condicions pro-inflamatòries, com la resposta de fase aguda, és la presència en circulació de la isoforma C4BP(β^-) la que s'incrementa, induint un canvi en la *ratio* C4BP(β^+):C4BP(β^-) de $\sim 80:20$ a $\sim 50:50$. Com hem vist prèviament, durant la resposta de fase aguda es produeixen canvis en el perfil biosintètic de molts òrgans,

particularment del fetge, que condueix a un increment de les concentracions plasmàtiques de nombroses proteïnes (els reactants de fase aguda) necessàries per retornar la funció normal a l'organisme. Durant la primera etapa de la fase aguda, els macròfags tissulars activats i els monòcits alliberen tot un espectre de mediadors i de citocines pro-inflamatòries que regulen específicament la transcripció d'aquests reactants de fase aguda. En aquest cas, les citocines pro-inflamatòries condicionen l'expressió diferencial dels gens *C4BPA* i *C4BPB* mantenint estable el nivell de C4BP(β +) i resultant en una secreció incrementada de C4BP pràctica i exclusivament composta per la isoforma C4BP(β -) (108).

1.3.1.3 Funcions de C4BP en relació amb la seva estructura

Ambdues isoformes de C4BP tenen la mateixa capacitat d'inhibir el sistema de complement i exerceixen aquesta funció mitjançant el control de C4b de diferents maneres (19,97):

- Actua com a cofactor de la serina proteasa FI en la inactivació proteolítica de C4b tant soluble com unida a membrana. Probablement perquè C4BP induïx un canvi conformacional sobre C4b esdevenint susceptible a l'escissió per FI, que escindeix C4b per a la seva inactivació (iC4b) alliberant el fragment C4d (**Figura 10**), evitant així la formació i reconstitució de la C3 convertasa (C4bC2b) de la via clàssica (109).

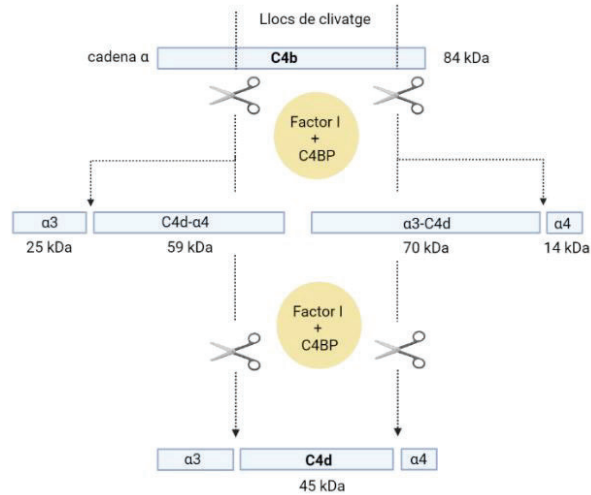


Figura 10. Representació esquemàtica de l'activitat de C4BP com a cofactor en l'escissió de C4b pel FI

L'escissió de C4b pel FI requereix la presència d'un cofactor específic, en aquest cas C4BP. El FI genera un clivatge en la cadena α de C4b en els dos llocs indicats per la línia discontinua. El clivatge en només un d'aquests llocs (escissió parcial) genera els fragments α3-C4d (70 kDa) i el fragment α4 (14 kDa) o bé, el fragment α3 (25 kDa) i C4d-α4 (59 kDa), formes inactives de C4b (iC4b). Si es produeix un clivatge complet de la cadena α, en els dos llocs indicats (escissió completa) allibera el fragment C4d (45 kDa). Adaptat de (109).

- Evita de forma directa l'assemblatge de la C3 convertasa de la via clàssica unint la C4b que es va formant.
- Accelera el decaïment natural del complex C4bC2b.
- Addicionalment, C4BP actua com a cofactor de FI en l'excisió de C3b en fase fluida, inhibint secundàriament la via alternativa del complement (110) tot i que no redueix l'activitat hemolítica de C3b unida a membrana, a menys que es trobi en una concentració molt elevada, ni sembla tenir la capacitat d'inhibir la C3 convertasa per la via alternativa. Així doncs, C4BP no es capaç de substituir al Factor H.

A nivell estructural, cada cadena α de C4BP es capaç d'unir una molècula de C4b, tot i que només quatre molècules de C4b es poden unir simultàniament a una de C4BP i altres dos amb menys força, degut als impediments estèrics. La seva afinitat per unir C4b es troba en el rang micromolar baix (111). La seva naturalesa oligomèrica la fa

especialment eficient en la degradació de C4b dipositada sobre les superfícies cel·lulars, ja que hi ha una cooperació entre les diferents subunitats en la unió de C4b immobilitzada. De fet, la molècula monomèrica és molt menys eficient en la inhibició de la C3 convertasa. En concret, el lloc d'unió per a C4b en C4BP involucra els dominis CCP1-CCP3 i aquests no només són importants, també són suficients en la prevenció de l'assemblatge de la C3 convertasa (112). Particularment, un clúster d'aminoàcids carregats positivament en la interfície entre CCP1 i CCP2 són crucials per a la unió amb C4b i per l'habilitat de regular la C3 convertasa. Tanmateix, CCP2 i CCP3 són molt importants, ja que les seves deleccions aboleixen completament l'habilitat de C4BP per unir C4b, el que correlaciona directament amb la pèrdua de funció sobre la inhibició de la C3 convertasa. L'espaiament entre aquests CCPs també és crucial. La deleció de CCP1 té també un efecte significatiu, tot i que no destrueix de forma completa l'activitat funcional de la cadena α (112). La pèrdua d'unió amb C4b resulta en una pèrdua de totes les seves funcions inhibidores dins de la via clàssica del complement.

L'activitat com a cofactor de C4BP pel FI també depèn de la regió CCP1-CCP3 i té aquesta independència funcional. Inclús una variant més curta i monomèrica de C4BP, amb només CCP1-CCP3, és activa. Per contra, les variants que no tenen CCP1 i/o CCP2 i/o CCP3 són completament inactives. En la realització d'aquesta funció, C4BP també és capaç d'unir C3b però la C4BP que ha d'haver a la superfície cel·lular requerida per a la interacció és més elevada que la necessària en cas de la unió a C4b. La unió amb C3b requereix els 4 CCPs N-terminals de les cadenes α , sent CCP2 i CCP3 els més importants. Tanmateix, s'han identificat dues mutacions concretes en CCP3 que resulten en la pèrdua de l'habilitat de C4BP per actuar com a cofactor de FI en l'escissió tant de C4b com de C3b. Ambdós mutants conserven intacta la unió amb C4b/C3b i afecten a la formació i decaïment de la C3 convertasa de la via clàssica però sembla que no indueixen el canvi conformacional en C4b i C3b que les fa susceptibles a l'escissió pel FI (110).

Els dominis N-terminals CCP1-CCP3 a més d'unir les proteïnes del complement C3b i C4b, uneixen altres lligands com heparina, pentraxines, LRP-1, CD40, DNA, i les proteïnes de superfície de diversos patògens (99).

- La unió de C4BP amb heparina és relativament de gran afinitat i requereix els dominis CCP1-CCP3 de la cadena α , sent CCP2 el domini més important, així com el clúster d'aminoàcids carregats positivament en la interfície entre CCP1 i CCP2, involucrats també en la unió amb C4b, tot i que la rellevància fisiològica d'aquesta unió no està clara. Sembla que el lloc d'interacció per heparina i C4b es solapen àmpliament (112,113).
- La unió de C4BP amb SAP, de la família de les pentraxines, té lloc amb una estequiometria 1:1 i es localitza en el *core* central de C4BP, però, tot i que es troba separat del lloc d'unió per a C4b, aquesta unió inhibeix l'habilitat com a cofactor del FI en l'escissió de C4b, el que suggereix que la formació del complex C4BP-SAP en algunes condicions pot influenciar la regulació del complement (114). De la mateixa família de les pentraxines, C4BP també uneix la CRP per la seva part central, una zona que no es troba disponible per a la unió en C4BP(β)-PS degut a impediments estèrics per la presència de la cadena β i de PS (115). Es per això que aquesta interacció és més rellevant en la resposta de fase aguda quan la isoforma C4BP(β -) s'incrementa.
- C4BP també interacciona amb LRP-1 (CD91), que és un receptor d'endocitosi involucrat en el catabolisme de diferents proteïnes plasmàtiques. La unió sembla estar mediada pel mateix lloc d'unió que la heparina. LRP-1 podria estar mediant, en part, el catabolisme de C4BP (116).
- C4BP també interacciona amb CD40, un receptor de superfície cel·lular identificat i caracteritzat en cèl·lules B, tot i que també es troba en monòcits, DCs i cèl·lules endotelials. La seva activació, via CD40L té un rol central en les respostes mediades per cèl·lules T i B, però també en immunoregulació. La unió de CD40L amb CD40 en la cèl·lula B resulta en un increment de l'expressió superficial de tota una sèrie de marcadors, activació de la proliferació i rescata les cèl·lules B de l'apoptosi en els CGs. Malgrat aquest fet, les cèl·lules B circulants no són una diana important de C4BP, ja que només una petita fracció de cèl·lules B es troben en la circulació; si s'ha demostrat però que C4BP colocalitza en els fol·licles limfoides secundaris amb les cèl·lules B. Aquesta interacció es produeix amb la

cadena α , però els requeriments estructurals i el significat biològic encara són desconeguts (117).

- A més, C4BP es troba capturada en la superfície de diferents patògens. Els agents infecciosos com virus, bacteris i paràsits han desenvolupat estratègies eficients per evitar el seu aclariment i destrucció per part del sistema de complement. Amb aquest objectiu, alguns patògens segresten reguladors del complement i en conseqüència disminueixen l'activació de la cascada del complement, contribuint a la seva resistència davant les diferents proteïnes sèriques i a la seva patogenicitat. Així, C4BP pot ser capturada per diferents bacteris per disminuir la seva opsonització i evitar la seva fagocitosi. S'ha localitzat interacció de C4BP amb *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* K1 i *Candida albicans*, en diferents regions localitzades entre CCP1 i CCP3 de la cadena α en solapament amb el lloc d'unió de C4b (97).

Adicionalment, sota condicions fisiològiques la isoforma majoritària C4BP(β +) es troba unida a PS (70 kDa), formant el complex C4BP(β +)·PS, com hem comentat prèviament. Però mentre que C4BP(β +) no existeix sense PS, PS si existeix en forma lliure (aproximadament un 30% del total) i en la seva forma unida. Una molècula de PS s'uneix a una cadena β mitjançant una interacció no covalent de gran afinitat que esdevé més forta en presència de calci, amb una estequiometria 1:1 (100) a través del domini N-terminal CCP1 de la cadena β (118,119). La unió de PS a C4BP no afecta la seva habilitat per regular la C3 convertasa de la via clàssica, però PS perd la seva capacitat anticoagulant, com a cofactor de la proteïna C activada en la degradació dels factors de coagulació Va i VIIIa (120). El balanç però entre PS lliure i unida a C4BP es manté en uns nivells estables, ja que la falta de PS lliure incrementaria el risc d'una trombosi venosa. Així, en condicions de fase aguda, malgrat que els nivells de C4BP en plasma s'incrementin, aquest increment que es degut a una síntesi incrementada del cadena α , resulta en la formació de C4BP(β -), el que permet mantenir els nivells de PS lliure estables.

En aquest sentit, el complex bimolecular C4BP(β +)·PS exerceix rols addicionals en el sistema de coagulació i també en la regulació del sistema de complement per unió

amb cèl·lules apoptòtiques (121–123). Aquest últim aspecte és degut a que PS, a través del seu domini N-terminal que conté àcid γ -carboxiglutàmic, es capaç de localitzar C4BP en les superfícies cel·lulars on hi ha fosfolípids carregats negativament exposats, com la fosfatidilserina, present en la superfície de les cèl·lules apoptòtiques. De fet, mentre que la unió de PS lliure a les cèl·lules apoptòtiques estimula el procés fagocític, el complex C4BP(β^+)-PS inhibeix la captació fagocítica (122). C4BP(β^+) unida mitjançant PS a les cèl·lules apoptòtiques és capaç d'unir C4b, suggerint que continua tenint la capacitat per inhibir l'activació del sistema de complement, prevenint així la inducció de la resposta inflamatòria que caracteritza l'eliminació de cèl·lules apoptòtiques en condicions homeostàtiques (124). D'acord amb això, es creu que en la fase inicial de l'apoptosi cel·lular disminueix la capacitat d'unir molècules inhibidores en la membrana i s'inicia el procés fagocític durant el qual, les cèl·lules apoptòtiques adquireixen la capacitat d'unir C1q o MBL i activar el sistema de complement amb la deposició corresponent de C3 i C9. Aquesta unió de components del complement és molt important i com hem vist, les seves deficiències són factors de risc en el desenvolupament del LES. Posteriorment, en la fase tardana de l'apoptosi, C4BP(β^+)-PS s'uneix i atorga protecció contra una activació excessiva del complement en la cèl·lula apoptòtica ja que la inducció de la seva lisi resultaria en l'alliberament de contingut intracel·lular potencialment inflamatori a l'ambient extracel·lular, el que no és compatible amb les propietats anti-inflamatòries del procés apoptòtic. Posteriorment, el reconeixement per part dels fagòcits, evita la lisi de la cèl·lula apoptòtica i la consegüent resposta inflamatòria. D'aquesta manera C4BP(β^+)-PS no bloqueja completament l'activació del complement però sí proporciona un ambient inhibidor que evita la seva activació excessiva i el desencadenament de la lisi cel·lular (124).

1.3.1.4 Funció immunomoduladora de C4BP(β^-) sobre Mo-DCs

En relació amb les funcions no canòniques de tot l'espectre de proteïnes de fase aguda i proteïnes del sistema de complement que tenen la capacitat d'interaccionar directament amb els fagòcits mononuclears, especialment amb les DCs, en la inducció un fenotip regulador, com hem vist prèviament; en estudis previs realitzats en aquest grup s'ha comprovat que la isoforma C4BP(β^-), però no C4BP(β^+), presenta una

activitat novell, exercida per interacció directa amb Mo-DCs *in vitro*, només en les primeres etapes de la diferenciació dels monòcits a DCs, que comporta la inducció d'un fenotip anti-inflamatori i tolerogènic, conservant una activitat endocítica elevada i característiques morfològiques pròpies de les cèl·lules immadures. Després de ser estimulades amb LPS, aquestes Mo-DCs pre-tractades amb C4BP(β -) presenten característiques fenotípiques i funcionals anàlogues a les iDCs, amb una baixa expressió de CD83, CD86 i CD80 en superfície, una inhibició de la producció de citocines pro-inflamatòries del tipus Th1 com IL-12, TNF- α , INF- γ , IL-6 i IL-8 i per contra, una expressió incrementada de citocines anti-inflamatòries com TGF- β i IL-10, inhibint la resposta immunitària del tipus Th1 i induint la diferenciació de cèl·lules T cap a un fenotip supressor o regulador; així com una expressió reduïda de CCR7 i en conseqüència, de la seva capacitat quimiotàctica, evitant també la proliferació de cèl·lules T al·logèniques i promovent la diferenciació de les cèl·lules Treg (94). La **figura 11** mostra un model d'actuació d'aquesta proteïna en condicions inflamatòries de fase aguda.

En aquest estudi (94), la utilització de variants que presentaven delecionats de forma individual els diferents CCPs que conformen la cadena α de C4BP(β -), per l'avaluació del seu efecte sobre les Mo-DCs, va revelar que el domini CCP6 és necessari per induir aquest fenotip anti-inflamatori i tolerogènic en les Mo-DCs descrivint una nova funció no canònica per C4BP(β -) addicional a la seva funció reguladora del complement i a les prèviament exposades.

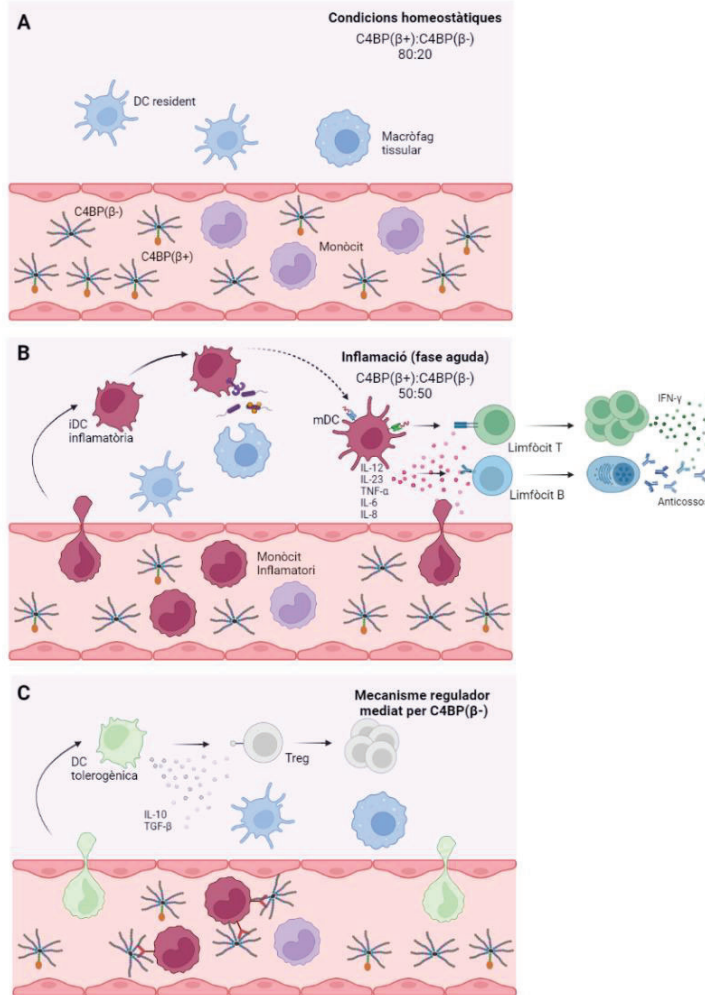


Figura 11. Funcions fisiològiques de C4BP(β-) en la resposta immune-inflamatòria cel·lular

D'acord amb aquest model, l'inhibidor de les vies clàssica i de les lectines del sistema de complement, C4BP presenta dues isoformes: **(A)** C4BP(β+) (80%) i C4BP(β-) (20%). **(B)** Les condicions pro-inflamatòries induïxen una modificació en la *ratio* C4BP(β+): C4BP(β-) fins a un 50:50, degut a un increment dels nivells de la proteïna de fase aguda C4BP(β-). Diferents evidències suporten una acció específica de la sobre-expressió de C4BP(β-) sobre els monòcits inflamatoris i les Mo-DCs. Els estímuls inflamatoris (infecció, nefritis lúpica, etc.) desencadenen la presència de monòcits inflamatoris en la sang, els quals són reclutats activament cap als teixits inflamats i diferenciats cap a DCs inflamatòries, amb l'habilitat d'estimular cèl·lules T *naïve*. **(C)** Sota aquestes condicions, a més de la seva funció com a inhibidor del complement, l'increment de la presència de C4BP(β-) en la sang podria actuar de diferents maneres a través de l'activació d'un o més, encara desconeguts, receptors de superfície cel·lular: reduint la migració trans-endothelial i acumulació dels monòcits inflamatoris en el teixit inflamat i induint un fenotip tolerogènic en les DCs inflamatòries reclutades, el que podria desencadenar: inhibició de la proliferació de cèl·lules T i la diferenciació cap a cèl·lules Th1, Th2 i/o Th17 en funció del microambient inflamatori, disminució la secreció de citocines pro-inflamatòries (IL-12, TNF-α, IFN-γ) i reducció de la migració cap als nòduls limfàtics; i contràriament, inducció de l'alliberament de citocines anti-inflamatòries (IL-10, TGF-β) i generació de Treg en els teixits inflamats.

1.3.2 DCs tolerogèniques com a tractament en malalties autoimmunitàries i inflamatòries

El potencial de les DCs amb caràcter tolerogènic i la constant ampliació en el coneixement dels mecanismes pels quals indueixen tolerància ha motivat el desenvolupament de protocols per generar aquest tipus cel·lular i el desenvolupament de nombrosos assajos *in vitro* i *in vivo* per l'avaluació de la factibilitat de potencials teràpies amb DCs tolerogèniques en el tractament de trastorns que cursen amb una sobre-activació de l'eix immune-inflamatori.

Diversos assajos clínics de fase I estan avaluant actualment la seguretat, tolerància i eficàcia de l'administració directa, per teràpia adoptiva, de DCs tolerogèniques generades *ex vivo* a partir de monòcits, com a tractament en trastorns autoimmunitaris i inflamatoris com la diabetis de tipus 1, l'artritis reumatoide, l'esclerosi múltiple, la malaltia de Crohn i el rebuig del transplantament renal i hepàtic (revisat en (125)). Així, a mesura que aquests assajos conclouen s'obté informació preliminar sobre la seguretat general de la seva administració, tot i que també destaquen les limitacions actuals sobre la seva eficàcia i el manteniment d'un fenotip tolerogènic estable amb els agents inductors d'immunomodulació sobre les DCs que s'utilitzen actualment. Així, utilitzant tant la informació derivada dels assajos *in vitro* com la dels assajos pre-clínic, les DCs tolerogèniques generades a través d'inductors immunomoduladors alternatius podrien brindar d'una oportunitat per incrementar el seu rendiment clínic en aquestes patologies immune-inflamatòries.

En l'actualitat, les teràpies aprovades pel tractament d'aquestes malalties inclouen l'administració d'immunosupressors, com molècules petites que inhibeixen la proliferació cel·lular fins a anticossos monoclonals que provoquen la depleció d'algunes poblacions, i de fet, aquests agents han millorat considerablement el pronòstic d'algunes malalties autoimmunitàries i inflamatòries, però moltes d'aquestes teràpies són fàrmacs no específics que requereixen una administració de llarg termini amb la toxicitat significativa associada i el risc de infeccions secundàries per la inducció d'un estat immunosupressor que involucra la inhibició de xarxes d'immunoregulació beneficioses.

En aquest context, la teràpia basada en la generació d'un estat semi-madur i tolerogènic en les DCs té el potencial de re-educar el sistema immunitari cap a l'homeòstasi, derogant les respostes autoimmunitàries o inflamatòries sense interferir en la immunitat protectora (126).

1.4 Malalties autoimmunitàries i inflamatòries

Una resposta adequada i efectiva cap als microorganismes invasors, a través de l'activació dels diferents tipus cel·lulars i dels mecanismes reguladors protegeix l'hoste del patògen sense causar una inflamació excessiva que produeixi dany en els teixits, mantenint un estat de salut caracteritzat pel retorn a l'homeòstasi. Per contra, una resposta immunitària desequilibrada o fora de control, per una activitat deficient (immunodeficiència) condueix a l'aparició d'infeccions severes o al desenvolupament de tumors; o bé per una sobre-activitat, condueix a l'aparició d'al·lèrgies i malalties autoimmunitàries i inflamatòries (127) (Figura 12).

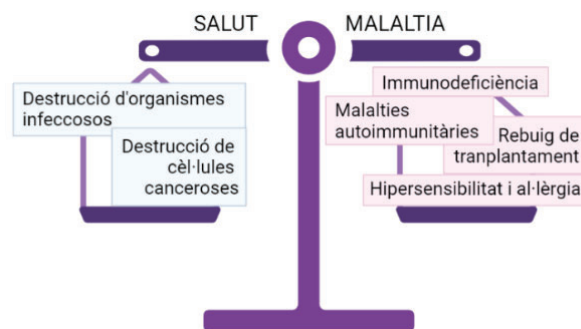


Figura 12. El rol dual del sistema immunitari en la salut i la malaltia

Les malalties autoimmunitàries sistèmiques i les malalties inflamatòries presenten una patofisiologia complexa i només parcialment descrita, que cursa amb diferents alteracions on s'involucren tots els components del sistema immunitari (128).

La resposta immunitària innata és molt important en el desenvolupament de la inflamació en general, i en les malalties inflamatòries cròniques i l'autoimmunitat en particular, ja que aquestes estan caracteritzades per una disrupció de l'homeòstasi immunològica i unes respostes inflamatòries de llarg termini o recurrents

desencadenades per antígens específics endògens o exògens. Tot i amb això, aquestes malalties han estat sempre considerades per ser generalment conduïdes per respostes immunitàries adaptatives, principalment per cèl·lules B i T auto-reactives sobre-activades. Això és degut a que la continua estimulació de les DCs per antígens propis o no propis, incrementa l'activitat de les cèl·lules B, conduint la producció d'anticossos, i les respostes mediatades per cèl·lules T amb la consegüent "pluja" de citocines pro-inflamatòries que condueixen els esdeveniments devastadors. De fet, tant els models animals com els estudis *in vitro* han confirmat el rol central de les DCs en la patogènesi de diferents malalties autoimmunitàries i inflamatòries (revisat en (129)). Per contra, l'ablació de les DCs en ratolins causa el desenvolupament espontani de la patologia autoimmunitària sota condicions basals (130), confirmant també el rol essencial de les DCs en el manteniment de la tolerància immunològica i la prevenció d'autoimmunitat. Així, està clar que les DCs, proveïdes d'aquesta gran plasticitat funcional, juguen un rol essencial tant en el manteniment homeostàtic de la tolerància immunològica com en l'orquestració de la immunitat, per influència directa sobre el comportament de les cèl·lules B i T i per contribució cap a l'ambient inflamatori.

1.4.1 Lupus eritematós sistèmic

El lupus eritematós sistèmic (LES) és una malaltia autoimmunitària inflamatòria crònica i d'etiologia complexa. De forma generalitzada, es caracteritza per una alteració del sistema immunitari innat i adquirit que comporta una pèrdua de tolerància davant d'antígens propis que són reconeguts per anticossos, amb la consegüent formació d'ICs, la generació de cèl·lules B i T auto-reactives i la producció de citocines pro-inflamatòries, que inicien i amplifiquen l'estat d'inflamació contribuint al dany en els diferents òrgans.

El LES és una malaltia heterogènia en relació amb l'afectació dels òrgans implicats, les manifestacions clíniques i la severitat, tot i que en general, les afectacions més comunes involucren la pell, les articulacions, el sistema nerviós central i especialment, els ronyons, que caracteritzen l'afectació més severa, la nefritis lúpica (NL). El curs de la malaltia està caracteritzat per aquesta varietat de manifestacions clíniques

multisistèmiques amb períodes d'exacerbacions (brots) i de remissions, normalment associats amb l'efectivitat del tractament.

1.4.1.1 Epidemiologia

Segons la seva prevalença, és considerada una malaltia rara ja que es troba en un rang d'entre 20 a 150 casos per cada 100 000 individus, amb una gran variabilitat segons l'ètnia. En concret, mostra una freqüència incrementada en les poblacions asiàtiques, d'afroamericans, d'afrocaribenys i d'hispanoamericans. Tanmateix, el 90% de les persones afectes per LES són dones i es desenvolupa principalment en edat fèrtil (131).

1.4.1.2 Etiologia

El LES presenta una etiologia complexa i encara desconeguda amb un comportament estocàstic, on destaquen els factors hormonals, els factors ambientals i la susceptibilitat genètica, que desencadenen un desequilibri en la immunitat innata i adquirida.

- **Factors de risc hormonals:** aquest fet queda evidenciat per la prevalença majoritària que té la malaltia en el sexe femení i perquè els nivells elevats d'estrògens i de prolactina estimulen les respostes immunitàries per diferents mecanismes que contribueixen al desenvolupament de la malaltia (132,133).
- **Factors de risc ambientals:** aproximadament un terç dels germans monozigòtics presenten un LES concordant (134), destacant la importància dels factors ambientals en l'expressió de la malaltia. L'exposició a la llum ultraviolada desencadena fenòmens apoptòtics, que esdevindran un estímul immunoestimulador. Tanmateix, les infeccions, com ara per Epstein Barr i citomegalovirus poden actuar com a desencadenants (135). Alguns estudis suggereixen que les infeccions per microorganismes en general hi contribueixen, ja que provoquen activació dels TLRs crítics per a la presentació antigènica (136); de fet, els nivells sèrics de LPS s'han trobat incrementats en pacients de LES i els marcadors d'activació de LPS via TLR4, com és l'expressió incrementada de

CD14, correlacionen amb l'activitat de la malaltia (137). La composició de la microbiota també contribueix a l'expressió de la malaltia a través de diferents mecanismes, incloent el mimetisme molecular i el desencadenament de la resposta immunitària innata i la propagació de cèl·lules pro-inflamatòries Th17 (138).

- **Factors de risc genètics i epigenètics:** el locus *MHC* va ser el primer identificat com a locus de risc associat amb el LES i els al·lels contigus en aquest locus confereixen la major susceptibilitat genètica en la població (139). En les últimes dues dècades però, els estudis d'associació del genoma complet (GWAS) i els meta-anàlisi han permès reconèixer a prop de 100 loci de risc associats amb el LES (140), la majoria en regions reguladores que poden tenir efecte en múltiples gens i que estan relacionats amb altres malalties autoimmunitàries (141) on s'inclouen les vies d'apoptosi i aclariment d'ICs, les vies de senyalització de TLRs i IFN de tipus 1 (producció, detecció d'àcids nucleics i resposta) i les vies cel·lulars de senyalització de limfòcits B i T (**Taula 2**). Tanmateix l'ús extensiu de seqüenciació de l'exoma ha revelat un nombre creixent de formes monogèniques de LES (l·listats en (142)). D'entre les causes epigenètiques trobem la metilació del DNA, modificacions post-traduccionals d'histones i RNA no codificant que regulen l'expressió gènica (143), per exemple les cèl·lules T de pacients amb NL presenten una hipo-metilació dels gens reguladors de la via dels IFN (144), les diferències en la metilació de gens de la via dels IFN, NF- κ B i en la senyalització dels TLRs en neutròfils també resulta en diferències de l'activitat de la malaltia i varia segons l'ètnia (145). També hi ha fàrmacs com la procaïnamida i la hidralazina que inhibeixen l'acció de les metil-transferases incrementant l'emascarament d'àcids nucleics endògens conduint a l'activació de TLR9 (146). També s'han identificat canvis en l'expressió de miRNAs en cèl·lules mononuclears circulants i teixit renal de pacients amb LES (147,148). Per exemple, els nivells de miR-21, que regula la l'activació aberrant de les cèl·lules T, correlacionen amb els valors d'activitat de la malaltia (149).

Els diferents estudis realitzats amb la identificació de variants genètiques, models animals, estudis d'expressió gènica i anàlisis epigenètics, suporten el concepte de que l'activació dels sensors per àcids nucleics, la producció d'autoanticossos, un aclariment defectuós d'ICs i cèl·lules apoptòtiques, la formació de trampes extracel·lulars de neutròfils (NETs), la senyalització limfocitària i les vies de producció d'IFN són els protagonistes de la pèrdua de tolerància en el teixit danyat i conformen els trets característics de la patogènesi del LES.

	Efectes	Gens de susceptibilitat al LES	Formes monogèniques de LES i malalties relacionades
Autoantígens/ICs	Defectes en l'apoptosi, l'autofàgia, reparació de l'DNA i funció lisosomal	<i>NCF1/2, ATG5, HIP1, CDKN1B, CLEC16A, DRAM1, ATG16L2, SMG7, RAD518, TERT, LYSY, CTSB, GALC</i>	<i>NCF1^a, CYBB^a, PRKCD</i>
	Aclariment defectuós	<i>FCGSR2A, ITGAM</i>	<i>C1Q, C1R/C1S, C2/4, C3, PEPD</i>
Resposta immunitària innata	Senyalització TLR i IFN-1	<i>IFIH1, MIR146A, IRF5/7/8, JAK2, TYK2, TLR7, RNASEH2C, SLC15A4</i>	<i>ADAR^b, IFIH^b, DNASE1L3, TREX1^b, TMEM173^c, RNASEH2C/2B/2A^b, DNASE1, ACP5^d, SAMHD1^b</i>
	Pro-inflamació Senyalització NF-κB	<i>TNFAIP3, TNIP1, PRKCB, UBE2L3, NFKBIA</i>	
Resposta immunitària adaptativa	Senyalització i migració de cèl·lules immunitàries	<i>HLA II/III, STAT4, TNFSF4, BANK1, BLK, IL12A, TCF7, CD44, ZFP90, CD226, PRDM1, ARID58, CHTA/SOCS1, PTPN22, PTPRC, AFF1, RASGRP3, IKZF1/3, BACH2, ETS1, ELF1, SPRED2, LBH, LPP, CD80, PXK, LYN, CSK, IL10, CD40, CXCR5, TNFSF138, CCL22, GRB2, DEF6, IL12B, SH2B3, IKZF2, PLAT, RASGRP1, ITPR3, DGKQ, IFNLR1</i>	<i>FASLG^e, FAS^e, SHOC2^f, RAG1/2^g, KRAS^h, PTPN11^h</i>
Funció desconeguda		<i>NMNAT2, TET3, TMEM39A, UHRF1BP1, ATXN1, JAZF1, WDFY4, EDEM3, ABHD6, MYNN, ANKS1A, CARMIL1, SLC17A4, XKR6, RPEL1, PCNX3, OLIG3/LOC100130476, PKIA/ZC2HC1A, DHCR7/NADSYN1, PHLDB1, DDX6/TREH, GPR19/CREBL2, PLD2, NBDY, PRICKLE1, FAM98B, SIGLEC6, SYNGR1, CXorf21, PRPS2, FAM86B3P/PRAG1/CLDN23/MFHAS1</i>	

Taula 2. Gens de risc en el LES classificats per cada via

S'indiquen els gens de susceptibilitat identificats per GWAS, meta-anàlisi i *fine-mapping*. També s'indiquen els gens amb deficiències o mutacions rares que s'associen amb formes monogèniques de LES o malalties tipus LES. a, defectes en *NCF1* i *CYBB* causen malaltia crònica granulomatosa; b, *ADAR*, *IFIH1*, *TREX1*, *RNASEH2C/2B/2A* i *SAMHD1* causen síndrome d'Aicardi-Goutières; c, defectes en *TMEM173* causen vasculopatia associada a *STING* infantil; d, defectes en *ACP5* causen espondiloencondrodisplàsia osteoimmunitària; e, *FAS* i *FASLG* causen síndrome autoimmunitari limfoproliferatiu; f, defectes en *SHOC2* causen síndrome de Noonan amb pèrdua de cabell; g, defectes en *RAG1/2* causen immunodeficiència severa combinada i; h, defectes en *KRAS* i *PTPN11* causen síndrome de Noonan. Adaptat de (140).

1.4.1.3 Patogènesi del LES i desenvolupament de la NL

Durant les últimes dècades, la recerca multidisciplinària sobre el LES ha permès construir una visió més concisa de la seva patogènesi i la de la NL. Cal destacar però, que l'heterogeneïtat clínica de la malaltia correlaciona àmpliament amb la multitud de vies que poden conduir al dany orgànic. La **figura 13** és una representació dels fenòmens que desencadenen i contribueixen al desenvolupament del LES i que explicarem en detall a continuació.

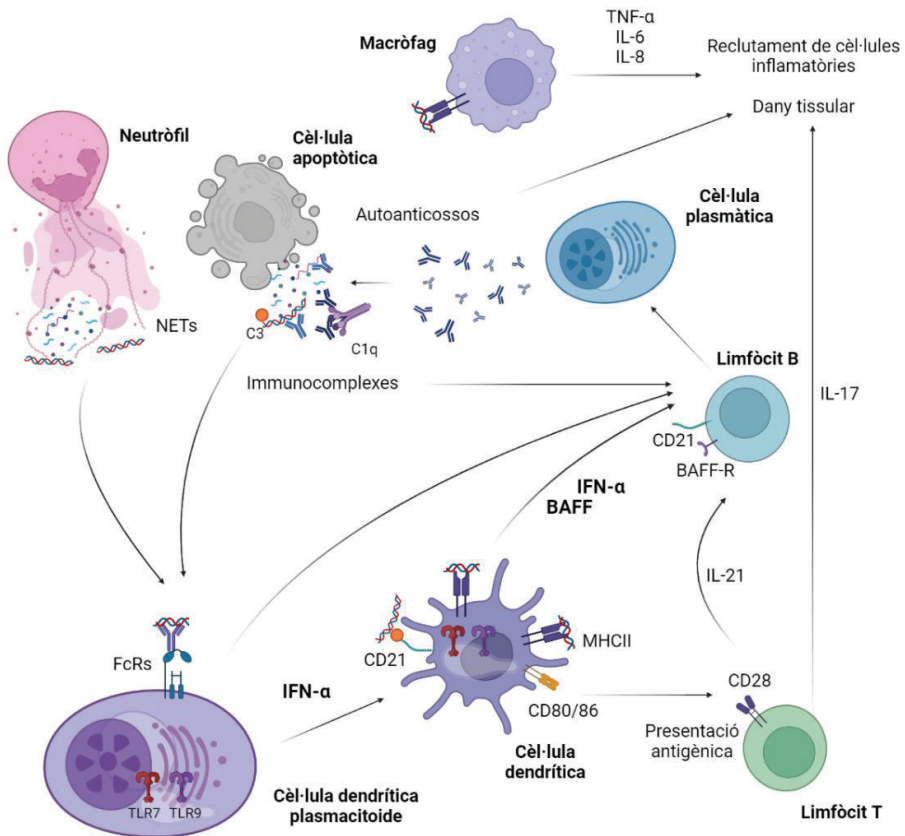


Figura 13. Desenvolupament del procés immunitari en el LES

Els neutròfils i les cèl·lules apoptòtiques configuren l'inici de la cascada patogènica en el LES. Els cossos apoptòtics, que contenen DNA i RNA associat a proteïnes i els neutròfils que alliberen trampes extracel·lulars (NETs), contribueixen a aquesta font de contingut nuclear que esdevé antigènic i que és endocitat per les cèl·lules dendrítiques plasmacitoïdes. A través de l'activació de TLR7 i TLR9, s'indueix la secreció d'IFN-α. Paral·lelament, les cèl·lules apoptòtiques també activen la secreció de citocines inflamatòries que activen el reclutament de cèl·lules en els teixits. Les cèl·lules B i T també participen en aquest procés d'auto-reactivitat, en el cas de les cèl·lules B amb la producció d'autoanticossos, i les cèl·lules T amb la producció d'IL-17 que contribueix a la infiltració de cèl·lules immunitàries en els òrgans. Adaptada de (142).

1.4.1.3.1 Desencadenament de la resposta immunitària: reconeixement d'antígens propis i formació d'ICs

El LES es desenvolupa en individus amb una combinació de variants genètiques i/o altres defectes immunoreguladors, com s'ha explicat anteriorment, que desencadenen els mecanismes conductors de l'aparició de la malaltia. El seu ordre temporal, no està ben definit, però podem establir dos punts clau desencadenants:

- Alteració de l'apoptosi amb deficient eliminació de cossos apoptòtics
 - Producció de NETs (NETosi) incrementada de neutròfils
- , que ambdós condueixen a un reconeixement anòmal d'antígens propis.

1.4.1.3.1.1 Alteració de l'apoptosi

El contingut nuclear normalment no és accessible pel sistema immunitari, però durant el procés apoptòtic el nucli col·lapsa, es fragmenta i es formen els cossos apoptòtics. D'aquesta manera, la cèl·lula allibera el contingut nuclear que és reconegut per anticossos, que esdevenen anticossos anti-nuclears (ANA) on s'inclouen els anticossos anti-DNA de cadena doble (dsDNA) i anticossos que reconeixen complexos d'RNA i proteïnes, que es denoten com Sm, RNP, SSA/Ro i SSB/La (en tots els casos els anticossos s'uneixen a la proteïna, no a l'RNA) (150) que donaran lloc a la formació d'ICs.

Com hem comentat prèviament, en condicions homeostàtiques, les cèl·lules apoptòtiques exposen senyals "*find-me*" i "*eat-me*" que les marquen per a la seva eliminació silenciosa per part dels fagòcits, però quan hi ha una situació d'apoptosi incrementada on la càrrega de apoptòtica excedeix el seu aclariment, o bé en cas d'un aclariment defectuós; les restes apoptòtiques persisteixen i poden estimular el sistema immunitari. Per tant, l'eliminació dels cossos apoptòtics és crucial pel manteniment de l'homeòstasi immunològica mentre que la seva acumulació i la formació conseqüent d'ICs està àmpliament associada amb el LES (151).

Aquest aclariment d'ICs i de cèl·lules apoptòtiques és dependent de l'activació del sistema de complement i l'opsonització amb C3b per a una eficient fagocitosis. Altres proteïnes del complement com C1q, C2 i C4 també tenen un paper rellevant en aquest

procés (152,153). De fet, més del 90% dels individus que presenten una deficiència genètica en *C1Q* desenvolupen LES sever. A més en els ratolins genèticament susceptibles a autoimmunitat, una deficiència en *C1q* provoca l'acumulació de cèl·lules apoptòtiques en els glomèruls renals (154).

En aquesta línia, un altre dels esdeveniments primerencs clau també pot involucrar el mal funcionament dels fagòcits de la línia mioide que tot mantenint intacta la seva capacitat per fagocitar cèl·lules o cossos apoptòtics, poden presentar defectes intrínsecs en la maduració lisosomal, per una disminució de l'acidificació lisosomal que condueix a la incapacitat per degradar els ICs fagocitats (155). Com a conseqüència, aquests són retornats intactes a la membrana cel·lular, on s'acumularan aquests antígens nuclears.

1.4.1.3.1.2 NETosi incrementada de neutròfils

En paral·lel a tot aquest procés, la presència d'organismes infecciosos o les partícules apoptòtiques circulants, provoquen l'extrusió de material cel·lular per part dels neutròfils, en un procés conegut com NETosi, que és un mecanisme de mort cel·lular que té lloc en resposta a aquests estímuls. El material alliberat es coneix com NETs, i conté citocines pro-inflamatòries, pèptids anti-microbians, enzims com mieloperoxidasa, histones i dsDNA citrulinat potencialment antigènic, que en aquest context proporciona encara de més càrrega antigènica. De fet, el material nuclear extrusionat per NETs representa la major font d'antígens nuclears (dsDNA, cromatina i RNA) que condueix el desenvolupament d'autoanticossos en el LES. A més, els pacients de LES presenten una població de neutròfils (anomenats granulòcits de baixa densitat) amb una propensió incrementada a la NETosi (156) i a mode de retroalimentació positiva, els autoanticossos i els ICs poden promoure l'alliberament de NETs esdevenint un cercle on els autoantígens alliberats per NETs condueixen a la formació d'autoanticossos que promouen l'alliberament de més material antigènic.

1.4.1.3.2 La signatura de l'IFN: pDCs i DCs mieloides

Les pDCs detecten àcids nucleics vírics i els seus anàlegs, a través de TLR7 i TLR9 (especialitzats per a ssRNA i DNA no metilat, respectivament) localitzats en els

endosomes. En el context que ens ateny, els ICs formats per autoanticossos IgG i àcids nucleics propis són endocitats per FcγRs i alliberats al compartiment endosomal de les pDCs per interaccionar amb TLR7 i TLR9 (també en cDCs i en cèl·lules B, que també expressen aquests FcγRs i els dos tipus de TLRs). Aquests receptors desencadenen la via de senyalització que condueix a la producció d'IFN-α, així com IL-12 i IL-6, entre d'altres citocines i quimiocines pro-inflamatòries. Tanmateix, les pDCs també produeixen secreció d'IFN-α en resposta al DNA endogen alliberat per neutròfils en procés de NETosi (157–159). Per aquest motiu, les pDCs han estat proposades com la font clau d'una producció aberrant d'IFN-α i les conductores principals de la progressió en el LES. L'IFN-α alliberat activa l'expressió de tota una sèrie de proteïnes que contribueixen a l'estat inflamatori. De fet, aquest patró d'expressió constitueix l'anomenada “signatura de l'IFN” (160) característica dels pacients amb LES actiu.

Aquesta “signatura de l'IFN” també és contribuïda per la secreció d'IFN-α per part de les DCs i dels macròfags. Les DCs activades i fora de control condueixen el fenomen d'autoimmunitat (161) connectant aquest circuit innat amb la immunitat adaptativa, per activació de les cèl·lules B i T. En concret, en les DCs dels fol·licles limfoides, les fDCs, els productes de C3 (C3d) que opsonitzen els ICs s'uneixen a CR2 procedint a la internalització antigènica i a l'activació del TLR7 endosomal que condueix a la producció d'INF-α (162).

1.4.1.3.3 La pèrdua de tolerància perifèrica: els limfòcits auto-reactius

La pèrdua de tolerància orquestrada per les cèl·lules B conflueix en la producció d'autoanticossos. Per una banda, les cèl·lules B *naïve* expressen CR1 i CR2, l'activació dels quals contribueix a incrementar la senyalització del BCR (163) i els antígens opsonitzats units a la superfície de les fDCs a CR2 també indueixen l'activació de les cèl·lules B, incrementant l'expressió de TLR7 (164).

D'altra banda, la secreció d'IFN-α provoca en les pDCs i les fDCs l'alliberament del factor activador de cèl·lules B (BAFF/BLyS). BAFF és un factor crític per l'homeòstasi de les cèl·lules B, nivells elevats del qual redueixen la rigorositat de la selecció de cèl·lules B, proveint-les d'un BCR més auto-reactiu, i ajudant a la diferenciació dels

limfòcits B en cèl·lules plasmàtiques productores d'autoanticossos, motivada també per alts nivells d'IL-6. Un cop activades, aquestes cèl·lules B madures, s'expandeixen i comencen a secretar més anticossos contra els components nuclears.

Les fDCs, amb una activació constant de TLR7 i TLR9 incrementen la seva supervivència, esdevenint cèl·lules presentadores d'autoantígens i aportant la senyal co-estimuladora sobre-expressada de CD80/86 per al receptor CD28, important per l'expansió i diferenciació de les cèl·lules T que esdevindran auto-reactives (158). La producció d'IFN- α junt amb una alteració en la producció d'IL-2 per part de les cèl·lules T (165) condiciona la disfunció i disminució de les cèl·lules Treg (166). Els nivells reduïts d'IL-2 també juguen un paper important en el procés patològic ja que resulta en una producció incrementada d'IL-17 i una activitat incrementada de les cèl·lules Thf que estaran relacionades amb el dany renal, com veurem més endavant.

Al final de tot aquest procés les fDCs esdevenen essencials per a la formació i manteniment de CGs que s'aniran formant de forma espontània, on retenen antígens durant llargs períodes de temps i secreten citocines com IL-6 i BAFF, promovent la diferenciació de cèl·lules B i la seva supervivència en estreta associació amb les Thf. Així, en aquests CGs les cèl·lules B es diferencien, són activades, entren en divisió, realitzen el canvi d'isotip dels anticossos que secreten contra antígens del nucli de diverses cèl·lules en diversos òrgans com el ronyó, la pell, els pulmons i les articulacions, esdevenint cèl·lules plasmàtiques secretores d'IgG i magnificant la pèrdua de tolerància (162).

En el cas concret del que tractarem a continuació, les grans quantitats secretades de BAFF incrementen la sensibilitat quimiotàctica de les cèl·lules B cap al teixit renal (167) on també s'encarrega de posicionar les cèl·lules Thf dins dels glomèruls renals (168) conduint a la neogènesi d'estructures limfoides terciàries o ectòpiques (ELS).

1.4.1.4 Nefritis lúpica

El tret més significatiu del LES és el desenvolupament de la NL, una condició inflamatòria greu que pot progressar cap a un estat d'insuficiència renal, esdevenint la

major causa de morbimortalitat en aquests pacients. De fet, en un 60% dels adults amb LES s'ha observat algun grau d'afectació renal i en un 10-30% dels pacients una NL severa que progressa cap a la insuficiència renal dins dels 15 anys des del diagnòstic, sent causa de mortalitat en el 10% dels casos (169). Així, el dany renal esdevé en aquests casos, el predictor més important de mortalitat.

1.4.1.4.1 Arquitectura glomerular

El **glomèrul renal** està format per una xarxa de capil·lars que s'originen en l'arteriola aferent i conflueixen en l'arteriola eferent, i ambdues entren i surten per la part vascular del glomèrul. La paret d'aquests **capil·lars glomerulars** constitueix la barrera de filtració i està formada per (de dins a fora de la llum): **cèl·lules endotelials** fenestrades, **membrana basal glomerular**, formada per col·lagen de tipus IV, laminina, fibronectina i altres glicoproteïnes i una capa de cèl·lules epitelials o **podòcits**, que presenten unes prolongacions que s'adhereixen a la membrana basal glomerular. A través d'aquesta paret, es filtra la sang que passa per l'interior dels capil·lars per formar l'orina primària a l'espai urinari. Els capil·lars glomerulars es troben immersos en una estructura formada per cèl·lules mesangials i matriu extracel·lular, anomenada **mesangi**. Tota l'estructura que conforma el glomèrul es troba envoltada per la **càpsula de Bowman**, que actua com a recipient del filtrat i dona origen, en el pol oposat de la part vascular, al túbul proximal. El glomèrul i la càpsula de Bowman formen, en conjunt, el **corpuscle renal (Figura 14)**. Histològicament, entre els corpuscles renals s'observa teixit intersticial renal constituït per fibroblasts, cèl·lules mononuclears i fibres de col·lagen situats en una matriu de proteoglicans, on s'ubiquen els **túbuls renals**, els vasos sanguinis i els nervis (170).

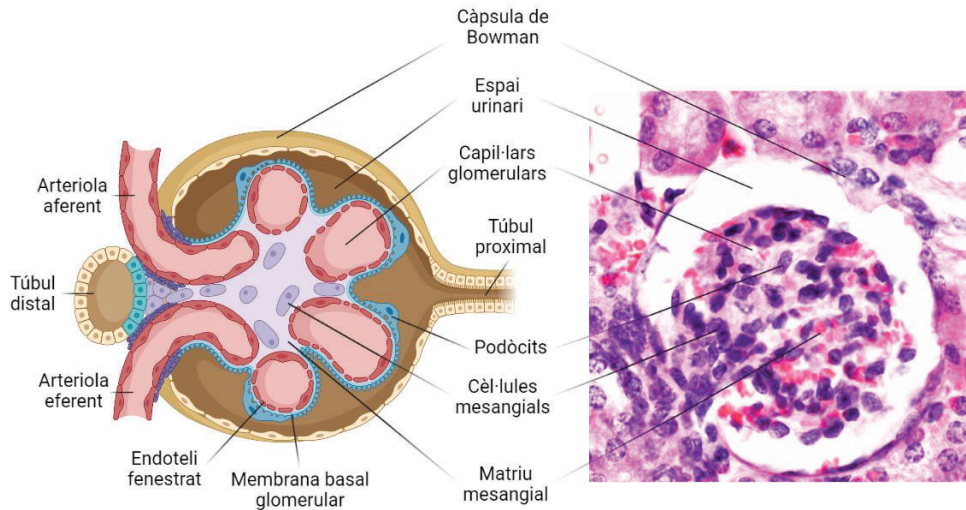


Figura 14. Estructura del corpuscle renal

A l'esquerra representació gràfica de les diferents parts que conformen el corpuscle renal i en detall les estructures i tipus cel·lulars que conformen el glomèrul renal. A la dreta imatge representativa de microscòpia òptica a gran augment amb tinció hematoxilina-eosina.

1.4.1.4.2 Patogènesi de la NL: la formació d'ELS i la disfunció renal

La NL es defineix com una glomerulonefritis que cursa amb la característica central del LES: la pèrdua sistèmica de la tolerància en les cèl·lules B que condueix al dipòsit d'ICs, inflamació i fibrosi glomerular i túbul-intersticial on la formació d'ELS, hi està directament implicada.

Les cèl·lules residents tenen un paper important en l'inici i propagació de la inflamació renal. De fet, la inhibició de l'activitat local de la proteïna quinasa dependent de calci/calmodulina tipus IV (CaMK IV) que contribueix a un increment de la proliferació mesangial i a una secreció de IL-6 (171,172), evita la deposició de ICs i el desenvolupament de nefritis (173).

De fet, el dany glomerular que té lloc en la NL està mediat per l'acumulació d'ICs formats *in situ* com a conseqüència de la presència d'anticossos anti-dsDNA contra components de les cèl·lules renals que activen les cèl·lules glomerulars a través dels FcγRs. Tanmateix, el component nucleic dels ICs també activa la inflamació via TLRs dels macròfags i les DCs intra-renals. Addicionalment, aquests àcids nucleics immune-

estimuladors activen l'endoteli glomerular, les cèl·lules mesangials i les DCs/macròfags per produir grans quantitats d'IFN- α . A la seva vegada, l'acumulació d'ICs resulta en l'activació del sistema de complement, especialment de la via clàssica i condueix a la generació de C3a i C5a que tenen l'habilitat d'atraure neutròfils i cèl·lules mononuclears (174). Finalment, els ICs poden activar altres components de la resposta inflamatòria com l'expressió de molècules d'adhesió en l'endoteli, afavorint el reclutament de leucòcits pro-inflamatoris. En conjunt, l'activació de TLRs, receptors del complement i FcyRs produeixen l'activació de les cèl·lules renals a alliberar citocines pro-inflamatòries com TNF- α , IL-6, TGF- β , IFN- γ , quimiocines i indueixen l'expressió luminal de molècules d'adhesió (175). Influenciades pel microambient inflamatori i quimioatracent les cèl·lules Th17 condueixen la resposta inflamatòria per producció d'IL-17 (176). De fet, IL-17 media el dany tissular local per inducció de la secreció de citocines pro-inflamatòries i indueix el reclutament d'altres cèl·lules immunitàries (177). Tanmateix, les cèl·lules B s'infiltraen en els glomèruls i l'espai túbul-intersticial. Aquestes cèl·lules infiltrades formen ELS perivasculares *de novo*, facilitant la trobada entre autoantígens, APCs i limfòcits, important durant l'inici i el manteniment de la resposta immunitària adaptativa.

Aquestes estructures limfoides són similars a les que trobem en els òrgans limfoides secundaris durant un procés normal de resposta immunitària, ja que estan formades per agregats cel·lulars de cèl·lules T i B (o CGs) que contenen fDCs (**Figura 15**), i són funcionals ja que estan associades amb l'expansió clonal *in situ* de les cèl·lules B i la hipermutació somàtica, mantenint els aspectes característics del que s'observa en els CGs dels fol·licles limfoides fisiològics (178).

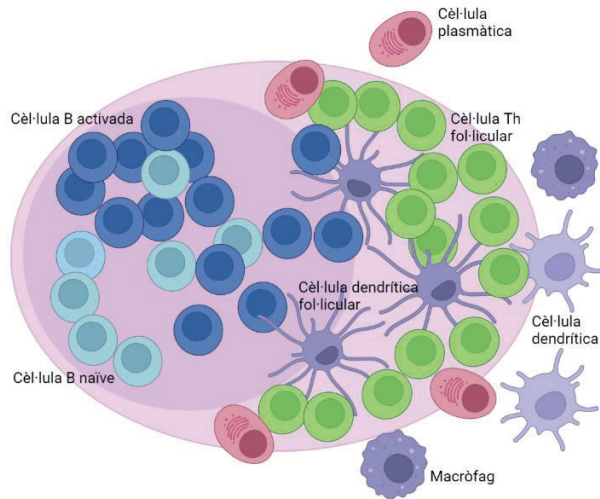


Figura 15. Organització dels fol·licles limfoides ectòpics

Les cèl·lules dendrítiques fol·liculars i les cèl·lules T helper (Th) fol·liculars, que envolten la zona de cèl·lules B, contribueixen a l'activació i diferenciació/especialització d'aquestes cèl·lules cap a cèl·lules plasmàtiques. La formació d'aquestes estructures facilita el contacte entre els diferents tipus cel·lulars.

Les cèl·lules B activades dins de les ELS organitzades esdevenen una font local d'autoanticossos, mentre que la constant secreció de BAFF assegura la seva supervivència, activant també les cèl·lules Thf que indueixen nivells elevats d'IL-21 en el teixit túbul-intersticial suportant la diferenciació i especialització de les cèl·lules B (168). A més, les gran quantitats d'IFN- α i TNF- α indueixen una signatura inflamatòria en els monòcits (179) que es localitzen al voltant dels glomèruls renal i adjacents als túbuls i capil·lars peri-tubulars en l'interstici renal diferenciant-se en DCs i macròfags inflamatoris intra-renals que s'associen amb l'acumulació d'agregats limfoides en els ronyons (180).

Així, la infiltració local i l'acumulació progressiva de cèl·lules immunitàries, la producció local d'autoanticossos, l'acumulació d'ICs en el parènquima local, l'activació del sistema de complement així com un increment en la producció de citocines i quimiocines pro-inflamatòries, indueixen un circuit d'inflamació crònica i dany glomerular, túbul-intersticial i endotelial en el ronyó, derivant en una regeneració insuficient del teixit i en la formació de teixit fibrós, que en última instància produeix el dany renal crònic.

1.4.1.4.3 Classificació de la NL

La localització dels dipòsits d'ICs defineixen el tipus de NL. Així, la formació d'ICs en l'espai mesangial causa les lesions de classe I i II, en el compartiment subendotelial de classe III i IV i la formació d'ICs subepitelials, que produeix dany en el podòcits, les lesions de classe V, així com la seva combinació amb les classes III i IV (181). La classificació histològica de la NL actualment vigent va ser proposada l'any 2003 per la Societat Internacional de Nefrologia/Societat de Patologia Renal (ISN/RPS) (182) tot i que recentment s'han establert algunes modificacions (183) (**Figura 16 i Taula 3**).

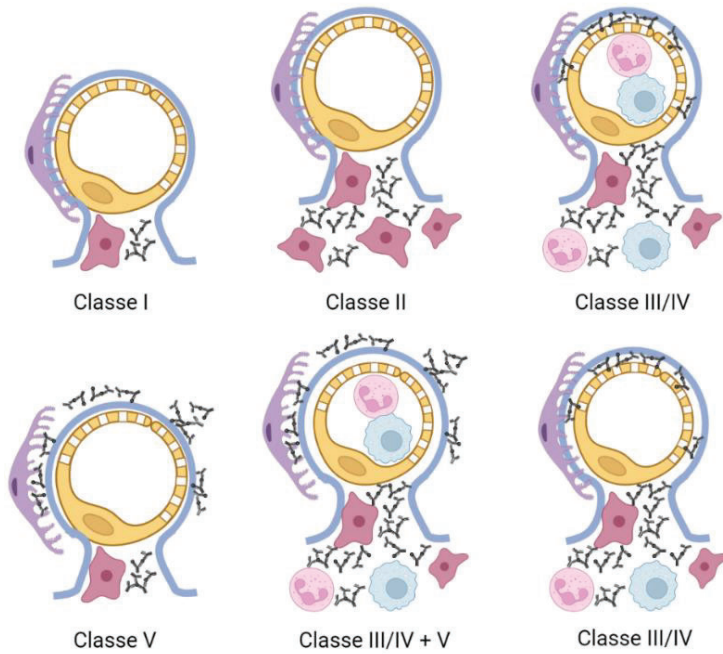


Figura 16. Representació gràfica de les característiques estructurals d'un únic capil·lar glomerular afectat per glomerulonefritis lúpica

La NL de classe I mostra dipòsits d'immunocomplexes (ICs) (color negre) en el mesangi però no hiperplasia de cèl·lules mesangials ni afluència de leucòcits; classe II amb dipòsits d'ICs en el mesangi i hiperplasia de cèl·lules mesangials (color vermell) però sense afluència de leucòcits; classe III/IV (a dalt) amb dipòsits d'ICs subendotelials i mesangials i amb afluència de leucòcits mesangials i capil·lars (en rosa els neutròfils i en blau els monòcits/macròfags); classe III/IV (a baix) amb dipòsits d'ICs subendotelials i mesangials, i afluència de leucòcits mesangials però no capil·lars; classe III/IV+V, dipòsits d'ICs subepitelials i subendotelials i afluència de cèl·lules immunitàries mesangials i capil·lars i; classe V amb nombrosos dipòsits d'ICs subepitelials però sense afluència de leucòcits. Podòcit: cèl·lula exterior en lila; cèl·lula endotelial: groc; cèl·lula mesangial: vermell; neutròfil: rosa amb nucli segmentat; monòcit/macròfag: blau clar; membrana basal glomerular: blau fosc. Adaptat de (183).

Tipus	
Classe I	Nefritis lúpica mesangial mínima Glomèruls normals (MO) però dipòsits immunitaris mesangials (IF)
	Nefritis lúpica mesangial proliferativa
Classe II	Hiperce·l·lularitat mesangial o expansió de la matriu mesangial (MO) amb dipòsits immunitaris mesangials (IF). Es poden detectar alguns dipòsits aïllats subepitelials o subendotelials (IF o ME)
	Nefritis lúpica focal^a Glomerulonefritis segmental o global endo- o extracapil·lar (<50% dels glomèruls) amb dipòsits immunitaris subendotelials focals. Amb o sense alteracions mesangials.
Classe III	III-A: lesions actives: nefritis focal proliferativa
	III-A/C: lesions actives i cròniques: nefritis focal proliferativa i esclerosant
	III-C: lesions cròniques: nefritis focal esclerosant
Classe IV	Nefritis lúpica difusa^b Glomerulonefritis segmental o global endo- o extracapil·lar (>50% dels glomèruls) amb dipòsits immunitaris subendotelials focals. Amb o sense alteracions mesangials.
	III-A: lesions actives: nefritis difusa proliferativa
	III-A/C: lesions actives i cròniques: nefritis difusa proliferativa i esclerosant
Classe V	III-C: lesions cròniques: nefritis difusa esclerosant
	Nefritis lúpica membranosa Dipòsits immunitaris subepitelials o les seves seqüeles morfològiques (MO, IF i ME), amb o sense alteracions mesangials.
	Pot presentar-se en combinació amb la classe III i IV. Pot mostrar esclerosi avançada
Classe VI	Nefritis lúpica esclerosant avançada ≥90% glomèruls globalment esclerosats sense activitat residual

Indicar i qualificar (lleu, moderat o sever) l'atrofia tubular, la inflamació intersticial i la fibrosi, així com la severitat de l'arterioesclerosi i altres lesions vasculares.

^aIndicar la proporció de glomèruls amb lesions actives i/o esclerosants

^bIndicar la proporció de glomèruls amb necrosi fibrinoide i/o semillunes

MO: microscòpia òptica; IF: immunofluorescència; ME: microscòpia electrònica

Taula 3. Classificació de la NL per la ISN/RPS

Classificació realitzada el 2003, actualitzada l'any 2018 segons (183).

La inflamació intersticial és una característica molt prominent de la NL que, independentment del grau d'afectació glomerular, identifica els pacients per al risc subseqüent de fallida renal (178).

1.4.1.5 Estratègies terapèutiques

En el LES, la prevenció de la progressió de la malaltia i dels brots és molt important per preservar la funcionalitat dels òrgans i evitar danys irreversibles, com el desenvolupament d'insuficiència renal quan hi ha una NL permanentment activa. A la vegada, existeix una morbiditat associada a la teràpia farmacològica. Per aquest motiu, són necessàries una sèrie de mètriques per controlar la simptomatologia i establir unes pautes de tractament. Amb aquest objectiu, hi ha nombrosos índexs que s'utilitzen per avaluar l'activitat de la malaltia (184) però ens centrarem en els dos que defineixen, per consens, els diferents estats per conduir la pauta de tractament:

- L'escala **SLEDAI** (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) s'ha utilitzat en els últims 30 anys (actualitzada l'any 2002) (185). És una escala basada en la presència de 24 descriptors en 9 òrgans que es documenten com presents o absents en els últims 10 dies i això confecciona una puntuació per a cadascun. La suma de tots ells configura la puntuació SLEDAI, del 0 al 105, on els valors alts representen més activitat de la malaltia. Un increment ≥ 12 es considera brot sever (186).
- L'escala **PGA** (*Physician Global Assessment*) es una mesura subjectiva de l'activitat de la malaltia que engloba el judici del metge. Es determina per una línia d'escala analògica visual de 10 cm, i una puntuació del 0 al 3 (tot i que els valors varien entre estudis (187)) per avaluar l'activitat de la malaltia en les dues setmanes anteriors. Un brot lleu puntua com a 1, fins a un brot greu que puntua com a 3 (186). Un increment ≥ 0.3 punts es considera un empitjorament de la malaltia i ≥ 2.5 cm entre visites es considera un brot.

En la pràctica clínica acostumen a utilitzar-se de forma conjunta i defineixen el tractament a seguir però també són necessàries per interpretar els resultats dels assajos clínics en el desenvolupament de noves teràpies. Amb les eines actuals de tractament, l'objectiu dels clínics es dirigeix a suprimir la malaltia activa i prevenir els complicacions derivades de la malaltia i el tractament. Per aquest motiu, són necessàries definicions concretes d'assoliment d'eficàcia. En aquest sentit, trobem el LLDAS (*Lupus Low Disease Activity State*) (188) que es defineix com un estat, que si

Introducció

es manté, s'associa amb una baixa probabilitat de resultats adversos, tenint en compte l'activitat de la malaltia i la seguretat dels medicaments (**Taula 4**).

Activitat de la malaltia
- Valors d'SLEDAI-2K ≤ 4 sense activitat en sistemes d'òrgans principals (renal, sistema nerviós central, cardiopulmonar, vasculitis, febre)
- Absència de característiques noves de la malaltia des de l'avaluació prèvia
- PGA ≤ 1
Tractament immunosupressor
- Prednisolona (o similars) < 7.5 mg/dia
- Immunosupressors a dosis de manteniment, incloent biològics aprovats

Taula 4. Definició de LLDAS en el LES

Adaptat de (188).

L'elecció i la pauta d'administració del fàrmac i la seva reducció fins arribar a retirar-se poden afectar al balanç entre el control de l'activitat de la malaltia i el dany als òrgans desencadenat per una immunosupressió de llarga durada i/o desproporcionada.

Per aquest motiu, i per tal d'optimitzar la utilització dels fàrmacs disponibles, ja que l'enfocament òptim del tractament roman incert, des del 2016 fins a l'actualitat, molts clínics i científics han volgut enfocar el tractament del LES cap a l'assoliment d'un estat de remissió complet. No obstant, s'ha reconegut que malgrat que el concepte de "remissió" pot ser intuïtivament clar, no hi ha una definició consensuada en el cas del LES. Així, per proveir d'un marc per la definició de remissió en el LES, es va engegar la iniciativa DORIS (*Definitions Of Remission In SLE*). Els primers resultats es van publicar l'any 2016 (189) i des de llavors, aquestes definicions establertes s'han avaluat en diferents cohorts, registres i assajos clínics, per seguir recollint dades i conduir així a establir recomanacions finals per a definir aquest estat de remissió (190) (**Taula 5**).

Valors de SLEDAI-2K = 0
Valors de PGA < 0.5 (0-3)
- Independentment de la serologia
- El pacient pot estar tractat amb anti-malàrics, corticoesteroides a baixa dosi (prednisolona < 5 mg/dia) i/o immunosupressors a dosis de manteniment, incloent biològics.

Taula 5. Definició de remissió en el LES

Segons DORIS 2021 adaptat de (190).

En referència a l'afectació renal, les recomanacions de l'EULAR/ERA-EDTA (*European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association*) per al control de la NL amb tractament immunosupressor es centren en assolir una resposta completa o parcial a nivell renal (**Taula 6**) (191). La resposta parcial té un pitjor pronòstic, però es considera suficient quan les opcions de tractament s'han esgotat o no es poden fer servir alguns tractaments degut a un risc elevat d'efectes adversos.

Resposta a nivell renal completa: <i>Ratio</i> proteïna en orina/creatinina < 50 mg/mmol o proteïnúria < 0.5 g/24h Taxa de filtració glomerular normal \pm 10%
Resposta a nivell renal parcial: Reducció dels nivells de proteïnúria \geq 50% Taxa de filtració glomerular normal \pm 10%

Taula 6. Definició de resposta completa i resposta parcial a nivell renal en el tractament de la NL

Adaptat de (191).

1.4.1.6 Tractament actual del LES

El tractament actual pel LES està dirigit a suprimir l'activitat de la malaltia però no a la seva cura, ja que la presència de cèl·lules plasmàtiques auto-reactives i de cèl·lules T immunitzades contra antígens nuclears, no poden ser eliminades per cap teràpia immunosupressora actual (174).

Les indicacions per al tractament del LES segueixen unes recomanacions internacionals indicades segons el tipus de manifestacions clíniques i el grau de severitat (192,193):

- **Corticoesteroides:** per al tractament de manifestacions severes com la NL i LES neuropsiquiàtric així com per tractar petits brots de la malaltia. Presenten importants efectes secundaris per acumulació de danys a llarg termini, pel que la dosi s'ha de reduir ràpidament procurant la seva retirada tant aviat com sigui possible.
- **Anti-malàrics** (cloroquina i hidroxicloroquina): per al tractament de les manifestacions lleus o moderades, especialment si hi ha *rash* cutani o artritis. Es

recomanen com a tractament de base en tots els pacients si no hi ha contraindicacions.

- **Immunosupressors:** dins d'aquest grup s'inclouen agents alquilants (ciclofosfamida), inhibidors de la inosina monofosfat deshidrogenasa (micofenolat de mofetil i àcid micofenòlic), inhibidors selectius de la síntesi de purina o pirimidina (azatioprina i metotrexat, respectivament) i inhibidors de la calcineurina (ciclosporina i tacrolimus). Aquests fàrmacs no tenen com a diana molècules específiques però suprimeixen diferents processos cel·lulars, principalment en limfòcits (excloent cèl·lules plasmàtiques) ja que són cèl·lules altament proliferatives que utilitzen vies metabòliques que constitueixen la diana d'aquests fàrmacs. Es recomana la ciclofosfamida com a primer fàrmac immunosupressor en el tractament del LES amb manifestacions greus, mentre que el metotrexat seria d'elecció en casos moderats amb manifestacions cutànies i articulars. La seva utilització està molt discutida en les recomanacions internacionals i normalment s'utilitzen com a teràpia combinada per aprofitar els diferents mecanismes d'acció i poder reduir la dosi efectiva de cadascuna.

Aquests tres grups de fàrmacs constitueixen el tractament convencional. La seva utilització presenta una morbiditat lligada ben descrita. En aquest sentit, molts pacients pateixen serioses complicacions, especialment infeccions severes degut a la immunosupressió de llarg termini associada al tractament i especialment amb l'ús de corticoesteroides, el desenvolupament d'algunes malalties cròniques com malalties cardiovasculars, osteoporosi, malalties oftalmològiques i diabetis de tipus II. A més, només una petita part dels pacients que reben aquest tractament assolixen una remissió del dany en el ronyó, mentre que el 20% acaben desenvolupant algun tipus d'insuficiència renal. Per aquest motiu, i en base al coneixement de l'etiopatogènesi de la malaltia, s'ha desenvolupat un nou grup de tractaments biològics, majoritàriament anticossos neutralitzants dirigits contra dianes moleculars pro-inflamatòries o alguns subtipus de leucòcits que estan en etapes pre-clíniques o en etapes clíniques inicials, amb l'objectiu de convertir-se en agents immunomoduladors eficients que no presentin

els efectes adversos de la immunosupressió d'ampli espectre que comporten els tractaments convencionals.

- **Fàrmacs biològics:** malgrat que hi ha un gran nombre de teràpies biològiques prometedores en desenvolupament, actualment disponibles i més utilitzats en la pràctica clínica trobem el belimumab i el rituximab.
 - **Belimumab:** anticòs monoclonal inhibidor de BLYS/BAFF. Es va convertir en el 2011 en el primer fàrmac aprovat per al tractament del LES des de 1957, subratllant les dificultats inherents als assajos clínics sobre aquesta malaltia. Ha mostrat eficàcia clínica però la magnitud dels efectes beneficiosos és modesta, com s'ha comprovat pels assajos de depleció de cèl·lules B (194,195). Es recomana en pacients amb LES actiu que no hagin donat resposta al tractament estàndard i que la seva activitat no vingui donada fonamentalment per afectació renal o neurològica.
 - **Rituximab:** anticòs monoclonal anti-CD20 que provoca una depleció de limfòcits B. Els estudis de cohorts observacionals van mostrar resultats satisfactoris però els assajos clínics randomitzats no van mostrar diferències significatives en el tractament amb rituximab o en els pacients placebo tractats amb metilprenisolona i micofenolat (196,197), possiblement per un punt final prematur. Tot i els resultats poc conclouents, aquest fàrmac s'utilitza per al tractament del LES neuropsiquiàtric, així com en altres manifestacions severes o quan no es respon a cap altre tractament.
 - Altres tractaments experimentals com l'ocrelizumab, que causa depleció de cèl·lules B i l'atacept, que bloqueja dos factors estimuladors de cèl·lules B, van produir taxes desproporcionades d'infeccions, mostrant els inconvenients que suposa afegir teràpia biològica a la teràpia immunosupressora basal. En assaig clínic amb sirukumab, inhibidor de IL-6, una minoria de pacients va reportar millores però va haver serioses infeccions produïdes en el grup de tractament, o amb abatacept, que bloqueja la interacció CD80/CD86-CD28, es va veure que no era més efectiu que els tractaments convencionals (198).

Així, en aquestes últimes dècades, s'han desenvolupat tota una sèrie d'agents biològics immunosupressors que no han tingut resultats satisfactoris en els assajos clínics. Per tant, en l'actualitat, per a les formes més lleus de la malaltia, el tractament d'elecció és hidroxicloroquina i fàrmacs anti-inflamatoris no esteroideus. Per a LES moderat, hidroxicloroquina i corticoesteroides són els fàrmacs d'elecció. Les teràpies immunosupressores es reserven per quan hi ha manifestacions severes en els òrgans. En el cas de LES refractari a ciclofosfamida o micofenolat de mofetil, es poden utilitzar fàrmacs biològics tot i que les teràpies que deplecionen les cèl·lules B poden trigar en exercir el seu efecte respecte els agents alquilants però són més beneficioses. Finalment, la utilització de belimumab és recomanable en aquells països on el tractament és cost-efectiu, en pacients amb LES amb malaltia activa però amb manifestacions clíniques que no suposen un risc per la vida (199).

Si amb el tractament s'assoleix un estat de remissió perllongat hi ha evidències dels beneficis de la reducció i retirada del tractament amb corticoesteroides però no hi ha encara suficient evidència relacionada amb la reducció i retirada eventual del tractament amb anti-malàrics i immunosupressors, tot i que en consideracions generals, és necessària una estreta vigilància per detectar signes prematurs de la malaltia o símptomes de recaiguda.

En línies generals, el tractament per al LES ha de ser multifactorial, tenint en compte la prevenció, la progressió, recaiguda, dany i comorbiditats des del moment del diagnòstic. El coneixement de la patogènesi de la malaltia ofereix una bona base per al desenvolupament de noves teràpies que vagin enfocades a aturar el dany tissular i la inflamació crònica, i a restaurar la tolerància immunitària.

La llista d'assajos clínics fallits es manté constantment en ampliació i es va actualitzant regularment però no hi ha esforços per canviar d'enfocament d'una forma radical (200), ja que no hi ha dubte de que cada biològic té un efecte en algunes persones amb LES, en general perquè actua contra la via que, de forma principal, produeix l'expressió de la malaltia en el grup de pacients responedors, tot i que això no sigui suficient.

1.4.1.7 Tractament de la NL

Hi ha tota una multitud de mecanismes involucrats en l'expressió de la NL, incloent ICs, complement, cèl·lules T pro-inflamatòries infiltrants, cèl·lules B productores d'anticossos, monòcits i els processos inherents a les cèl·lules residents que justifiquen la gran heterogeneïtat que presenta la malaltia i la resposta variable als fàrmacs i tractaments biològics.

Actualment, com a **tractament inicial**, l'elecció amb la millor *ratio* eficàcia/toxicitat, en pacients amb NL de classe III/IV (\pm V) són el micofenolat de mofetil/àcid micofenòlic o ciclofosfamida a dosi baixa, en combinació amb corticoesteroides (prednisona, prednisolona, metilprednisolona). Si hi ha nivells elevats de proteïnúria es pot combinar micofenolat de mofetil amb tacrolimus i si hi ha un gran risc de fallida renal es pot considerar una dosi alta de ciclofosfamida. Tanmateix, per a la NL de classe V pura es recomana micofenolat de mofetil/àcid micofenòlic en combinació amb metilprednisolona intravenosa i prednisolona oral posteriorment. El tractament amb hidroxicloquina es pot coadministrar en tots els casos.

Si s'assoleix una **remissió parcial o total** després de la teràpia d'inducció, per tal de mantenir aquest estat i prevenir les recaigudes, el tractament d'elecció són els immunosupressors, que mantenen estable la funció renal, redueixen els nivells de proteïnúria, i eviten la toxicitat lligada als corticoesteroides. Concretament l'ús de micofenolat de mofetil/àcid micofenòlic a dosi baixa o l'azatioprina en combinació amb una dosi baixa de prednisona. Tanmateix, la retirada gradual del tractament (primer els corticoesteroides i després els immunosupressors) es pot iniciar després de 3-5 anys en remissió completa, mentre que el tractament amb hidroxicloquina s'ha de continuar. En el cas de la NL de classe V pura, considerant prèviament el risc nefrotòxic, es pot considerar continuar, canviar o afegir el tacrolimus a dosi baixa. Contràriament, en **casos refractaris** el tractament es canvia a teràpies alternatives com el rituximab (201).

En casos d'hipertensió arterial associada s'utilitzen inhibidors o bloquejants de l'enzim convertidor d'angiotensina i estatines si s'incrementen els nivells de lípids. La

suplementació amb calci i vitamina D també pot reduir les comorbiditats associades a la malaltia i al tractament.

Desafortunadament, mentre que els estudis preliminars van mostrar resultats beneficiosos sobre la utilització d'agents biològics per al tractament de la NL, fins ara hi ha pocs assajos clínics que hi donin suport. Recentment s'han publicat els resultats d'un assaig clínic en fase III pel tractament amb belizumab en pacients amb NL activa (202) on es va comprovar que el tractament amb belimumab junt amb la teràpia estàndard (micofenolat de mofetil o ciclofosfamida) presentava eficàcia i seguretat per ser utilitzat en aquesta combinació. Actualment però, la utilització de fàrmacs biològics en pacients amb NL queda reservada per a casos severos o refractaris ja que encara no s'ha aprovat cap tractament específic per a la NL (175). Alguns factors que han fet difícil demostrar l'eficàcia dels tractaments biològics en els assajos són l'heterogeneïtat de les manifestacions clíniques, incloent diferències en la severitat de la simptomatologia, que varia en funció de la raça i els grups ètnics, la falta de consens sobre el punt final del tractament i els tractaments que es fan servir com a control.

1.4.1.8 Models murins experimentals de LES i NL

Els models animals de LES han ajudat a entendre la patofisiologia de la NL i han proveït de bases per definir les vies bàsiques que condueixen a la producció d'autoantígens cap al desenvolupament d'autoanticossos i de la progressió de la dany renal agut cap a la insuficiència renal. Els aspectes heterogenis d'aquesta malaltia, tant en la presentació clínica (involucrant diferents aspectes genètics i patofisiològics) no estan completament representats en els models animals actuals. Aquestes limitacions però no resten importància a les contribucions que han fet en el coneixement de la malaltia i en el desenvolupament de noves teràpies (203).

Hi ha models espontanis de LES, models induïts, transgènics i models *knockout* que indueixen LES (204). Els models espontanis i els induïbles són una eina essencial per estudiar l'etiologia de la malaltia, identificar dianes terapèutiques i per a la utilització pre-clínica de tractaments. Dins dels models espontanis clàssics s'inclouen NZBW F1, MLR/lpr i BXSB/Yaa, que estan genèticament predisposats a desenvolupar símptomes

prototípics del LES, incloent nivells elevats d'ANA i nefritis mediada per ICs. El model induït amb *pristane* i el model induït *nephrotoxic serum nephritis* també són útils en l'estudi de la resposta d'IFN de tipus I i la NL respectivament. Els models transgènics com el model de sobre-expressió del gens *Tgfb*, *Il10* i *Bcl2* o els *knockout*, com ara el *knockout* de cèl·lules B, han permès obtenir informació sobre el rol de gens específics en el manteniment de la immunotolerància sistèmica i la prevenció de la inflamació induïda per ICs. La **taula 7** mostra una comparació de les manifestacions característiques dels models espontanis i el model induït amb *pristane* en comparació amb el LES en humans i la **taula 8** sintetitza les vies implicades i els avantatges i inconvenients dels models murins més utilitzats.

	Humans		Models murins		
		NZBW F1	MRL- <i>lpr</i>	BXSB	Induït (<i>pristane</i>)
<i>Ratio</i> Femella (F) / Mascle (M)	F >> M	F >> M	F > M	M >> F	F >> M
Edat d'inici	15-44 anys	25 s	8 s	9 s	4 s
Supervivència mitja		45 s	17 s	30 s	25 s
Senyalització IFN	Força	Dèbil	Dèbil	No està clar	Força
Manifestacions clíniques					
ANA/anti-dsDNA	+	+	+	+	+
Complement baix	+	+	+	+	+
Nefritis	+	+	+	+	+
Alteracions neurològiques	+	+	+	-	-
Manifestacions cutànies	+	-	+	-	-
Artritis	+	-	+	-	-

Taula 7. Comparativa de les manifestacions característiques del LES en humans i en ratolins

Adaptat de (203).

	Vies implicades	Manifestacions	Avantatges	Inconvenients
Models espontanis	NZBW F1			
	Gens de susceptibilitat	Nefritis, vasculitis	Malaltia multigènica	Desenvolupament lent
	MRL-lpr			
	Apoptosi mediada per Fas	Nefritis, alteracions neuropsiquiàtriques i cutànies, vasculitis i artritis	Presenta moltes manifestacions clíniques del LES humà Inici precoç Malaltia severa	Mutacions en Fas no produeixen LES en humans Limfadenopatia i esplenomegàlia que no es manifesten en el LES humà
Models induïts	BXSB/Yaa			
	Producció d'IFN de tipus I mediada per TLR7	Nefritis	Avaluació dels mecanismes conduïts per TLR7	Predominança en mascles que no reflexa el LES humà
	Pristane			
	Producció d'IFN de tipus I	Nefritis, artritis, vasculitis pulmonar	Induïble en soques no autoimmunitàries Model de malaltia desencadenada per l'ambient	Soques amb susceptibilitat variable Mortalitat prematura (no relacionada amb el LES) Manifestacions lleus
Altres	Resiquimod / Imiquimod			
	Producció d'IFN de tipus I mediada per TLR7	Nefritis, esplenomegàlia	Autoimmunitat en mascles i femelles Inici precoç	Soques amb susceptibilitat variable Manifestació en els òrgans limitada
	<i>Nephrotoxic serum nephritis</i>			
		Nefritis	Induïble en soques no autoimmunitàries Inici precoç	Soques amb susceptibilitat variable Limitat a nefritis
Altres	Empelt contra l'hoste			
	Reaccions empelt contra l'hoste mediada per cèl·lules T	Nefritis	Avaluació dels mecanismes conduïts per cèl·lules T	Inici dels símptomes lent Manifestacions lleus Limitat a nefritis

Taula 8. Comparativa del mètode d'acció i els avantatges i inconvenients dels diferents models murins espontanis i induïts de LES

Adaptat de (203).

Per a la realització d'aquesta tesi doctoral s'han fet servir els models animals NZBW F1 i MRL-lpr.

1.4.1.8.1 New Zealand Black/New Zealand White F1 (NZBW F1)

La primera generació (F1) obtinguda del creuament entre els ratolins de les soques NZB i NZW (ambdues amb un *background* autoimmunitari) és el primer model murí de NL descrit i està considerat el model murí més semblant a la patologia del LES humana.

El creuament d'aquestes soques, NZB/NZW produeix ratolins que desenvolupen un nivell elevat d'ANA (principalment anti-dsDNA) a partir dels 5 mesos d'edat amb un màxim als 9 mesos (205). Tanmateix, desenvolupen glomerulonefritis mediada per ICs que s'assembla a la NL proliferativa difusa en humans. Les femelles NZBW F1 presenten una afectació més severa que els mascles, amb una taxa de mort per fallida renal del 50% als 9 mesos i als 15 mesos respectivament.

1.4.1.8.2 Murphy Roths Large/Lymphoproliferation (MRL-lpr)

Aquest ratolins s'obtenen del creuament de quatre soques diferents (LG, AKR, C3H i C57BL/6) i posseeixen el gen *lpr* (limfoproliferació), que codifica per a una forma defectuosa de Fas, la proteïna de superfície que media el procés apoptòtic dels limfòcits. Aquesta mutació, condueix a una inactivació del gen i una alteració de l'apoptosi mediada per Fas. Els ratolins MRL-lpr desenvolupen una síndrome autoimmunitària semblant al LES en humans i a altres malalties autoimmunitàries. Els ratolins MRL-lpr, presenten adenopatia massiva degut a l'acumulació de cèl·lules T, expansió policlonal de cèl·lules B i desenvolupen tot el panell d'autoanticossos (anti-dsDNA, anti-Sm, anti-Ro i anti-La). Tanmateix, a més de desenvolupar glomerulonefritis proliferativa difusa amb depòsits d'ICs glomerulars en les parets capil·lars i en regions mesangials, també presenten afectacions extra-renals com artritis, disfunció cognitiva, *rash* cutani i vasculitis. La majoria dels animals desenvolupen albuminúria i pèrdua de la funció renal entre els 3 i els 6 mesos d'edat i hi ha una taxa de mortalitat del 50% als 6 mesos d'edat amb un fenotip més accelerat en femelles però no tan prominent com en la soca NZBW F1.

1.4.2 Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa (CU) és una malaltia immune-inflamatòria crònica englobada, junt amb la malaltia de Crohn, dins de les malalties inflamatòries intestinals. Està caracteritzada per una inflamació superficial a l'intestí gros amb formació d'úlceres, limitada a les capes mucosa i submucosa, que s'inicia en el recte i s'expandeix proximalment a través del colon de manera contínua.

Introducció

El transcurs de la malaltia està caracteritzat per períodes de simptomatologia exacerbada (brots o recaigudes) i períodes de remissió. Els símptomes més característics són els problemes gastrointestinals com el dolor abdominal, diarrea amb moc i/o sang, nàusees i vòmits, tot i que també s'observen símptomes sistèmics com febre, pèrdua de pes i anèmia que poden requerir hospitalització. Les complicacions a llarg termini inclouen una disminució de la qualitat de vida i la productivitat, un risc incrementat de càncer colorectal i la possible necessitat d'intervencions quirúrgiques com la colectomia.

1.4.2.1 Epidemiologia

La incidència de CU mostra una tendència a l'alça en tot el món. A Europa i Nord Amèrica, els estudis suggereixen que s'està estabilitzant mentre que als països que s'estan industrialitzant s'accelera, esdevenint una malaltia global. A Europa la incidència és de 24.3 per 100 000 persones cada any i la prevalença de 505 per cada 100 000. Aquesta malaltia és menys comuna en els països de l'Est i del sud d'Europa, i 10 vegades menys prevalent en poblacions asiàtiques, africanes i orientals (206).

La CU presenta un patró d'incidència bimodal amb un pic principal d'aparició en el rang de 15-30 anys d'edat i un segon pic més petit entre els 50-70 anys (207) en ambdós sexes per igual i sembla que l'ètnia no juga un rol important en la seva epidemiologia. De fet, les persones que migren d'una àrea amb baixa incidència cap a una àrea amb incidència elevada, adopten la incidència elevada de la nova àrea on ha migrat (208). Tanmateix el fenotip entre els pacients de països com l'Índia i els de països de l'Oest no presenta grans diferències (209). Així, els estudis reporten que les diferències ètniques i racials estan més influenciades per l'ambient, els hàbits alimentaris i l'estil de vida que per diferències genètiques.

1.4.2.2 Etiologia

La CU es desenvolupa com a resultat de les interaccions entre els factors ambientals, la microbiota intestinal i els mediadors de la resposta immunitària en l'hoste genèticament susceptible.

- **Factors de risc genètics:** tot i que només d'entre un 8-14% dels pacients amb CU presenten una història familiar de malaltia inflamatòria intestinal, els familiars de primer grau d'una persona diagnosticada de CU presenten 4 vegades més risc de desenvolupar-la. Els bessons monozigòtics presenten una taxa de concordança del 6-13%. Tanmateix, el risc de desenvolupar CU és també de 3 a 5 vegades més elevat en la població jueva askenazi que en els altres grups ètnics (210). Aquestes dades suggereixen un component genètic en la malaltia, tot i que existeix una clara influència dels factors ambientals donat que la major part dels pacients diagnosticats no presenten antecedents familiars. Els estudis de GWAS han permès identificar més de 240 loci de susceptibilitat associats amb les malalties inflamatòries intestinals tot i que a prop del 50% d'aquests també estan associats a altres malalties immunitàries, 30 dels quals són específics de la CU i 137 compartits amb la malaltia de Crohn (210,211). La major part d'aquests gens estan involucrats en diferents aspectes de la immunitat intestinal, incloent la funció de la barrera mucosa intestinal, l'autofàgia, la restauració epitelial, la defensa contra microbis i la regulació de la immunitat adaptativa. El locus *TNFSF15 (TL1A)* està associat amb un risc incrementat de CU severa i altres estudis han associat també alguns polimorfismes predictors en els gens *IL1B*, *ABCB1/MDR17*, *HSP708* i *HLA-DR29* (212). Cal destacar però que molts individus portadors d'aquests al·lels de risc associats no desenvolupen mai la malaltia.
- **Factors de risc ambientals i estil de vida:** la incidència de CU és més elevada en països desenvolupats que en els que es troben en vies de desenvolupament i en zones urbanes més que en les rurals. Aquest fet es pot explicar parcialment per un millor accés a la sanitat que condiciona una menor exposició a infeccions entèriques durant la infància, disminuint la maduració del sistema immunitari i provocant una resposta immunitària inapropiada quan l'individu entra en contacte amb microorganismes infecciosos durant la vida adulta. Tanmateix, està relacionada amb l'adopció del tipus de vida en els països desenvolupats i la industrialització, com els canvis de dieta, la utilització d'antibiòtics, l'estatus higiènic i la pol·lució (213). D'entre els **factors protectors**, destaca el tabac (214) i l'apendectomia, reduint fins el 69% el risc del seu desenvolupament si s'ha

practicat abans dels 20 anys (215,216). D'entre els **factores de risc** trobem les infeccions gastrointestinals prèvies (*Salmonella spp* (diferents espècies), *Shigella spp* i *Campylobacter spp*), probablement perquè produeixen una alteració de la microbiota intestinal que predisposa a una inflamació crònica en pacients genèticament susceptibles (217). L'associació amb fàrmacs com els anti-inflamatoris no esteroideus és lleu (218), i la utilització d'anticonceptius orals està associada de forma moderada amb el desencadenament de la malaltia (219). Els **factores dietètics** s'han considerat àmpliament en relació amb el desenvolupament de la CU. Així, el consum de llet materna durant els primers anys de vida presenta un impacte positiu en el manteniment de la barrera epitelial intestinal, prevenint infeccions i proveint de beneficis immunològics directes (220), probablement per efecte directe sobre el microbioma (221). El consum d'àcids grassos omega 3 s'ha associat amb un risc menor de desenvolupament de CU. En detriment, el consum d'àcids grassos trans, el consum de sucres i d'edulcorants acompanyat d'un baix consum de vegetals, s'han associat amb el seu desenvolupament (222,223), aquest últim factor probablement degut a una falta de fibra (224).

- **Microbioma:** en relació amb els factors prèviament exposats, hi ha una creixent evidència de que alteracions en la microbiota intestinal juguen un paper important en la patogènesi de la CU. L'homeòstasi intestinal de la mucosa es basa en la coexistència fisiològica d'un abundant i divers ecosistema de bacteris comensals que colonitzen l'intestí. Malgrat les variacions interindividuais, els nivells taxonòmics més globals són similars entre individus, consistents en quatre *phyla*: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria i Actinobacteria (225). Així, la presència d'aquesta varietat, abundància i estabilitat en el microbioma, permet mantenir equilibrada la interacció entre la microbiota intestinal i l'hoste. Aquesta composició està atribuïda a influències multifactorials, com un component genètic, l'edat, el desenvolupament del sistema immunitari, la localització geogràfica i les modificacions en la dieta a curt i llarg termini. En el cas de la CU, el seu desenvolupament no està associat a cap bacteri específic. L'evidència mostra, com a indicador consistent, que en la CU hi ha una diversitat microbiana reduïda (226). En comparació amb els individus sans, els pacients amb CU presenten una

reducció en la microbiota del gènere *Bacteriodes* (que pertany a la *phyla* Bacteroidetes). Tanmateix, en la mucosa inflamada hi ha nivells més baixos d'*Enterococcus* i *Lactobacillus* (que pertanyen a la *phyla* Firmicutes) i més *Escherichia* i *Shigella* (de la *phyla* Proteobacteria) (227,228). Aquesta alteració en la composició de les poblacions de bacteris comensals es coneix amb el nom de **disbiosi** i condueix a un desequilibri en la resposta immunitària cap als antígens bacterians (210), tot i que no està clar si la disbiosi en la CU és un fenomen primari o secundari. Un altre aspecte important en la CU relatiu a la microbiota és la producció d'àcids grassos de cadena curta (SCFA), el metabòlit bacterià més estudiat, amb efectes anti-inflamatoris per la seva influència sobre el sistema immunitari intestinal, sobre la integritat de les cèl·lules epitelials i la producció de mucines per part de les cèl·lules de Goblet; aspectes que com veurem tindran un paper rellevant en la malaltia. A més, una baixa quantitat de butirac (un tipus de SCFA) en la llum intestinal engega processos metabòlics anaeròbics que generen estrès metabòlic, danyant les cèl·lules secretores de mucines i afavorint l'expansió de *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*, que alliberen enterotoxines, atacant i danyant de forma directa les cèl·lules epitelials i a la vegada, la mucosa, reduint les seves funcions protectores. En concordança, els pacients de CU presenten unes concentracions més baixes de SCFA que els controls sans (229). Cal destacar que els estudis en models animals han proveït d'un argument fonamental sobre el rol d'un microbioma alterat o una resposta immunitària aberrant cap al microbioma en el desenvolupament de la inflamació intestinal. El desenvolupament espontani de CU en models murins genèticament susceptibles no es produeix si els ratolins són generats i mantinguts en un ambient lliure de gèrmens o si són tractats amb antibiòtics, destacant el rol central de la colonització bacteriana en l'inici i/o perpetuació de les malalties inflamatòries intestinals experimentals (230,231).

1.4.2.3 Estructura de la barrera intestinal

La barrera intestinal constitueix una de les principals zones d'interacció del nostre organisme amb l'exterior i amb la microbiota intestinal. En l'estudi de la CU les capes superficials del teixit del colon són especialment importants: la capa mucosa i la capa submucosa.

La **capa mucosa** del tracte gastrointestinal es troba exposada a milions d'antígens provinents del menjar, l'ambient i la microbiota. La seva part més externa, tocant la llum intestinal, està formada per una **capa densa de mucines**, glicoproteïnes que recobreixen la superfície oferint protecció davant les agressions químiques i mecàniques generades pel contingut luminal i la motilitat intestinal. A la vegada, proveeix de la primera línia de defensa al sistema immunitari intestinal, ja que no només conforma una separació física entre els antígens i les cèl·lules immunitàries de l'intestí, també posseeix propietats anti-microbianes. Per sota, l'**epiteli intestinal** està format per una línia de cèl·lules epitelials polaritzades amb una regió apical i una regió basolateral amb característiques moleculars diferents. Aquestes cèl·lules epitelials mantenen l'espai intercel·lular segellat perquè la barrera intestinal sigui funcional, mitjançant unions intercel·lulars integrades per unions estretes, unions adherents i desmosomes (232,233). Les **unions estretes** estan formades per diferents proteïnes entre les quals destaquen les proteïnes transmembrana claudines i ocludines, i les *zonula occludens* (ZO), que mantenen les claudines i ocludines lligades al citoesquelet d'actina. Tanmateix, l'epiteli intestinal a nivell del colon està format per diferents tipus cel·lulars (234):

- Els **colonòcits** són les cèl·lules epitelials del colon. Conformen el 90% dels tipus cel·lulars en l'epiteli i són responsables del transport transcel·lular d'ions, aigua, nutrients i vitamines cap a l'interior de l'organisme.
- Les **cèl·lules de Goblet** sintetitzen i secreten mucines. S'ha observat que aquestes cèl·lules poden detectar antígens de la llum intestinal ja que expressen TLR1, TLR2, TLR4 i TLR5 (235). A més, produeixen i secreten substàncies biològicament actives que contribueixen a la immunitat innata, com pèptids anti-microbians i

citocines que regulen el sistema immunitari i estimulen la divisió de les cèl·lules mare de l'epiteli (236).

- Les **cèl·lules Tuft** i **enteroendocrines** representen una població petita en l'epiteli tot i que tenen funcions essencials en la defensa contra helmints (237) i la producció i secreció d'hormones (238), respectivament.

Aquest epiteli columnar simple descansa sobre una capa de teixit conjuntiu denominat **làmina pròpia**, delimitada per una **capa muscular** prima que promou el contacte de l'epiteli amb el contingut luminal (**Figura 17**). Totes aquestes estructures i tipus cel·lulars es distribueixen formant invaginacions de l'epiteli cap a la làmina pròpia de la mucosa, anomenades criptes de Lieberkühn, on es duu a terme l'auto-renovació de l'epiteli en un ordre ascendent, situant les cèl·lules mare precursors al fons de la cripta.

La **capa submucosa**, situada sota la capa muscular de la mucosa, és l'encarregada d'irrigar les capes circumdants i drenar-les, ja que conté els vasos sanguinis i limfàtics.

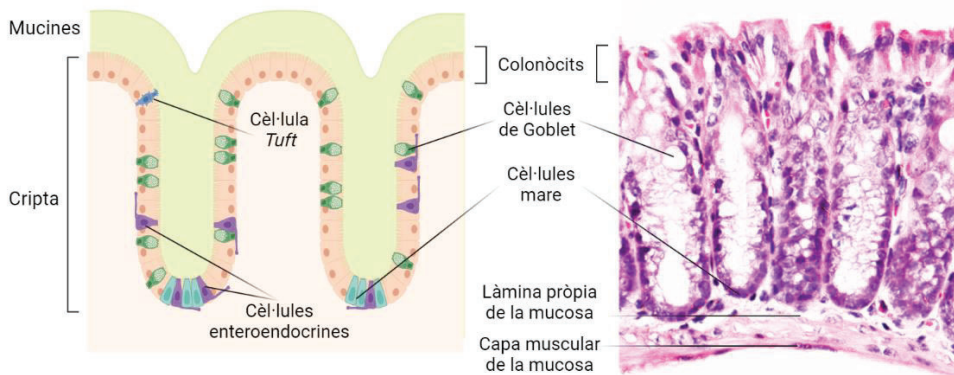


Figura 17. Estructura de les criptes intestinals

A l'esquerra representació gràfica de les diferents parts que conformen les criptes intestinals a nivell del colon i en detall els tipus cel·lulars que conformen l'epiteli. A la dreta imatge representativa de microscòpia òptica a gran augment amb tinció hematoxilina-eosina.

1.4.2.4 Patogènesi de la CU

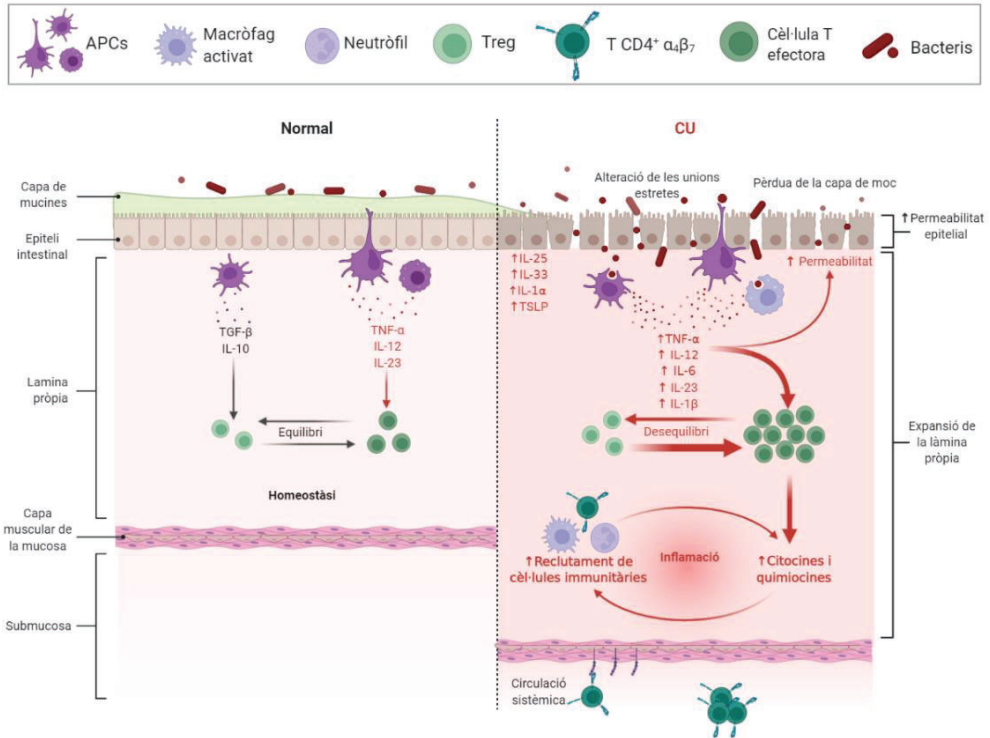


Figura 18. Representació dels canvis que contribueixen a la patogènesi de la CU

La barrera epitelial constitueix la primera línia de defensa contra la invasió bacteriana. Així, en condicions fisiològiques, la relació que s'estableix entre la microbiota i el sistema immunitari està basada en l'equilibri, on l'epiteli intestinal, recobert per una capa de mucines, evita la penetració dels bacteris intestinals. La integritat de la barrera intestinal, a més, està reforçada per la presència de les unions estretes entre les cèl·lules epitelials, així com per les cèl·lules immunitàries de la làmina pròpia presents en un estat d'immunotolerància. Per contra, en la CU, els canvis en la microbiota (disbiosi) i una disminució de la síntesi de mucines, resulta en una disrupció de la barrera intestinal del colon que facilita el contacte entre la microbiota i l'epiteli. Aquest fet produeix dany sobre la barrera epitelial conduint a una permeabilitat incrementada amb una pèrdua de les unions estretes que desencadena interaccions no homeostàtiques entre la microbiota entèrica i la immunitat de les mucoses, alterant la resposta contra els bacteris comensals, amb activació dels colonòcits i cèl·lules presentadores d'antigen (APCs), resultant en la producció de citocines innates, de quimiocines i de molècules d'adhesió en el endoteli, que provoquen l'atracció dels neutròfils, que conformen la primera línia de la resposta cel·lular en aquesta malaltia, i de limfòcits. Tanmateix, l'equilibri de cèl·lules T (entre reguladores i efectores) s'altera, ja que la producció de citocines per part de les DCs i els macròfags diferenciats a partir dels monòcits infiltrats condueix cap a una resposta mediada per Th2, Th9 i Th17 resultant en una secreció de citocines pro-inflamatòries efectores que contribueixen a incrementar la permeabilitat de la barrera intestinal i promouen un ambient inflamatori en la mucosa intestinal. TNF: factor de necrosi tumoral; TGF: factor de creixement transformant; IL: interleucina; TSLP: limfopietina estromal tímica.

La **figura 18** és una representació que compara les condicions homeostàtiques normals al teixit intestinal amb els fenòmens que condueixen al desequilibri i la resposta inflamatòria en la CU i que explicarem en detall a continuació.

El primer sistema de vigilància que troben els patògens quan entren per les superfícies mucoses són els colonòcits i les DCs intraepitelials ja que en l'epiteli del colon, les DCs formen unions estretes amb els colonòcits i estenen les dendrites cap al lumen. Aquests colonòcits o cèl·lules epitelials constitueixen la diana de molts patògens per a la seva replicació i el seu reconeixement informa a l'hoste de l'alteració d'aquesta primera barrera. De fet, els colonòcits expressen selectivament en la seva superfície basolateral TLR1, TLR2, TLR4 i TLR5 (235). Aquest patró d'expressió assegura que només els bacteris invasius, però no els luminals, desencadenen l'estimulació dels TLRs en la mucosa intestinal. A més, en resposta al dany o a l'estrès cel·lular, aquestes cèl·lules epitelials poden alliberar citocines innates com IL-25, IL-33, IL-1 α i limfopoiètica estromal tímica (TSLP), per activar ILCs locals i limfòcits de memòria residents (239).

Sota la capa epitelial, en la làmina pròpia resideixen DCs, macròfags i mastòcits que estan especialitzats en detectar patògens que han creuat la barrera epitelial. Aquestes cèl·lules també expressen PRRs, l'activació dels quals indueix la secreció de citocines inflamatòries innates com TNF- α , IL-12, IL-6, IL-23 i IL-1 β (240) i quimiocines que promouen el reclutament de monòcits, neutròfils, eosinòfils i basòfils des de la circulació, per aconseguir una ràpida contenció dels patògens per fagocitosi, secreció de grànuls tòxics i lisi dels patògens i cèl·lules infectades.

1.4.2.4.1 Disfunció de la barrera epitelial

Encara es desconeix si una alteració de la funció de la barrera intestinal precedeix el desencadenament de la malaltia o és el desenvolupament d'inflamació en la làmina pròpia de la mucosa el que indueix la disfunció de l'epiteli (233). En qualsevol cas, la disrupció de la barrera mucosa i una disminució en la síntesi i secreció de mucines, evidenciada perquè els pacients amb CU presenten un nombre de cèl·lules de Goblet reduït (241), condueix a una disfuncionalitat de l'epiteli i a un increment de la

permeabilitat de la mucosa davant dels antígens luminals degut a una fuga d'immunoglobulines des de la sang al lumen intestinal i en sentit contrari, per absorció de productes bacterians i/o antígens presents en la dieta, resultant en una estimulació del sistema immunitari innat i en la consegüent captació antigènica. Els nivells d'IgG específiques per a antígens presents en la dieta es troben incrementats en la sang i en biòpsies del colon de pacients amb CU activa respecte pacients amb CU inactiva o controls, units a FcγRI en neutròfils, que adquireixen la capacitat d'induir l'alliberament de citocines pro-inflamatòries com TNF-α.

De fet, en aquesta malaltia, com veurem en les properes pàgines, la secreció de citocines juga un paper essencial (240). El desequilibri de citocines anti-inflamatòries i pro-inflamatòries cap a la secreció de citocines pro-inflamatòries conduirà al desenvolupament d'una resposta immunitària excessiva associada amb un bucle d'activació i infiltració de cèl·lules immunitàries, una apoptosi de les cèl·lules epitelials incrementada i la pèrdua d'integritat de la barrera epitelial intestinal.

1.4.2.4.2 Activació de les cèl·lules innates: neutròfils i ILCs

D'entre les cèl·lules de la immunitat innata, els neutròfils constitueixen el component principal dels infiltrats inflamatoris en el teixit intestinal dels pacients amb CU i són el primer tipus cel·lular que participa en la fase activa de la malaltia. En aquest sentit, els neutròfils incapaciten els microorganismes a través de l'alliberament de NETs, que com hem explicat prèviament, contenen cromatina condensada, DNA i components dels grànuls, com mieloperoxidasa, que catalitza les reaccions d'àcids que condueixen a la formació d'espècies reactives d'oxigen involucrades en la inactivació de microorganismes, contribuint en conseqüència al dany tissular i a la formació d'úlceres (242). De fet, en mostres de femta de pacients de CU, la concentració de mieloperoxidasa és 5 vegades superior respecte persones sanes. A més, la presència de LPS i la secreció de TNF-α incrementen l'alliberament de NETs. En conseqüència, tot i que no és una malaltia caracteritzada per la presència d'autoanticossos, si presenta un tipus d'autoanticòs associat, els anticossos contra el citoplasma de neutròfils (ANCA).

Recentment, s'ha caracteritzat el paper de les ILCs en la patogènesi de la CU. Aquestes ILCs no presenten receptors d'antigen i s'identifiquen com les cèl·lules homòlogues als diferents subtipus de cèl·lules Th però en la branca innata de la immunitat (243). Així, ILC1 són funcionalment similars a Th1, ILC2 a Th2 i ILC3 a Th17, pel que proporcionen protecció mitjançant una secreció de citocines més immediata i local respecte els seus equivalents en les cèl·lules Th. En el teixit inflammat de la mucosa, la població d'ILC1 s'incrementa com a resultat de la mobilització per la secreció d'IL-12 i IL-18 per part de les DCs, i aquestes produeixen IFN- γ que contribueix als processos patogènics. En l'etapa més crònica de la CU, el nombre d'ILC2 augmenta en resposta a IL-33, secretada per les cèl·lules epitelials en resposta al dany epitelial (també en altres condicions com infecció per paràsits o exposició a al·lèrgens) i aquestes cèl·lules alliberen IL-5, responsable del reclutament de neutròfils a les àrees inflamades i IL-13, que provoca una disrupció de la funcionalitat de la barrera epitelial intestinal. Per contra, les ILC3 disminueixen, el que condueix a una reducció de l'expressió protectora d'IL-22 i a la disfunció de la barrera intestinal (244).

1.4.2.4.3 La captura antigènica i activació de les APCs

En paral·lel a l'activació de la cascada inflamatòria innata i la producció de citocines per part dels colonòcits, les APCs involucren al sistema immunitari adaptatiu.

En el desenvolupament de la CU, les DCs mostren una expressió incrementada de TLR2 i TLR4 en la superfície. L'activació d'aquests receptors desencadena la cascada inflamatòria via NF- κ B, canviant el seu estat funcional de tolerància, secretor d'IL-10, cap a un fenotip activat (245) estimulant la transcripció dels gens pro-inflamatoris, i resultant en un increment de la producció de citocines que condueixen a l'activació dels limfòcits i a la seva diferenciació. D'entre les seves funcions, les DCs pro-inflamatòries poden metabolitzar la vitamina A per produir àcid retinoic, que sota aquest context inflamatori assoleix un paper oposat a la seva funció ben coneguda com a inductor de tolerància, induint en aquest cas, l'expressió de la integrina- α 4 β 7 i del receptor de quimiocines CCR9 en els limfòcits T. D'aquesta manera, els limfòcits T activats passaran dels nòduls limfàtics mesentèrics a la circulació sistèmica i podran unir-se als seus respectius lligands (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*

(MadCAM-1) de les cèl·lules endotelials vasculars de la mucosa i CCL25 en les cèl·lules epitelials de la llum intestinal, respectivament), crítics pel transport dels limfòcits cap a la làmina pròpia del colon inflammat (246).

D'altra banda, l'equilibri entre macròfags intestinals de tipus M1 i M2 es modifica cap a un fenotip de tipus M1 pro-inflamatori pel que aquestes cèl·lules esdevenen secretores de citocines pro-inflamatòries com TNF- α , IL-6 i IL-23 i incrementen la seva capacitat presentadora d'antigen, fagocítica i citotòxica.

1.4.2.4.4 Els limfòcits i les citocines com a mediadors i efectors de la resposta

La inflamació en el teixit intestinal està associada amb l'activació i maduració de les cèl·lules T. La citotoxicitat de les cèl·lules T CD8⁺ condueix al dany tissular que exacerba els processos inflamatoris, causant dany directe sobre les cèl·lules epitelials i en última instància, contribuint a la formació d'úlceres en l'intestí (247).

En pacients amb CU, s'ha observat una activitat incrementada, així com un nombre incrementat de limfòcits Th2, Th9 i Th17, amb una inhibició simultània de l'activitat i nombre de limfòcits Th22, Treg i Breg anti-inflamatoris.

Després del processament antigènic, els macròfags i les DCs presenten l'antigen als limfòcits T CD4⁺ i per secreció d'IL-4 i IL-33 indueixen la seva diferenciació cap a **limfòcits Th2**. De fet, en la CU, la població de limfòcits Th2 s'incrementa en els infiltrats inflamatoris i condueixen al desenvolupament d'un estat inflamatori crònic i una fibrosi progressiva del teixit (248). Aquestes cèl·lules medien la resposta de tipus humoral secretant IL-4 mentre que per secreció d'IL-5, IL-13, IL-21 i IL-25 inhibeixen l'activitat de les cèl·lules Th1 involucrades en la resposta cel·lular. IL-13 té un paper clau en la CU afectant negativament a la integritat de la barrera intestinal per inducció de l'apoptosi en les cèl·lules epitelials, provocant una disrupció de les unions estretes i inhibint la regeneració de l'epiteli, un efecte exacerbat per TNF- α (249). Tanmateix, la diferenciació dels **limfòcits Th9**, secretors d'IL-9, provoquen una disrupció de la integritat de la barrera intestinal i contribueixen a la desgranulació dels neutròfils (250). Paral·lelament, l'adherència de bacteris intestinals a l'epiteli resulta en l'activació de

les DCs i les condiona a secretar IL-6 que junt amb la presència de TGF- β , IL-1 β i IL-23 a l'intestí activen la transducció de la senyal que condiona la polarització cap a **limfòcits Th17**, que secreten IL-17, IL-21, IL-22, IL-12 i TNF- α (138). IL-17 activa la secreció de quimiocines per part dels monòcits i les cèl·lules endotelials per incrementar la quimiotaxi de limfòcits i neutròfils cap al teixit inflammat contribuint a la inflamació crònica (251). La concentració incrementada de TGF- β en la làmina pròpia, a la vegada provoca una depleció de limfòcits Th22, produint un desequilibri entre Th17/Th22 en pacients amb CU (252). Les cèl·lules Th22 tenen una funció protectora en la barrera intestinal per inducció de l'expressió de proteïnes de les unions estretes i per secreció d'IL-22 que també és secretada per cèl·lules NK, limfòcits Th17 i sobretot per ILC3 (253). IL-22 està àmpliament associada amb un rol beneficiós en el tracte gastrointestinal ja que indueix la producció de pèptids anti-microbians, assegura el manteniment i restauració de la barrera intestinal per estimulació de la diferenciació de les cèl·lules mare intestinals i la restitució de les cèl·lules de Goblet; tot i que també se li ha associat un rol perjudicial en la inflamació intestinal parcialment explicat per una disrupció prèvia de la barrera intestinal i condicionada per l'ambient inflamatori de citocines existent, tot i que la seva producció en el colon inflammat estaria principalment associada a cèl·lules NK i Th17 (254).

Així, mentre que en línies generals, IL-10 i IL-22 presenten un efecte protector sobre la barrera intestinal, IL-13 i IL-9 provoquen la seva disrupció per inducció de l'apoptosi en les cèl·lules epitelials de la barrera intestinal. Tanmateix, la funció de les citocines depèn àmpliament de l'ambient, per exemple TNF- α potencia l'efecte d'IL-13, i TGF- β en absència d'IL-6 suprimeix la polarització de les cèl·lules T naïve cap a Th17 i l'estimula cap a Treg. L'expressió de TGF- β en el colon es veu incrementada per la presència d'IL-33, secretada pels colonòcits com una alarmina en resposta al dany tissular (37,255). Així, IL-33 a més d'induir la diferenciació de Treg, que expressen el seu receptor, també promou la seva funció, tot i que la presència d'IL-23, clau en la patogènesi de la CU, limita la resposta de les Treg a IL-33 (256). De fet, en pacients amb CU, tot i que el nombre de cèl·lules Treg es troba incrementat, aquestes cèl·lules esdevenen apoptòtiques amb facilitat en els teixits inflamats (257) i presenten una activitat supressora disminuïda (258).

La **taula 9** recull, de manera estructurada, totes les citocines i quimiocines que juguen un paper rellevant en aquesta malaltia, el seu nivell d'expressió i la seva funció; i la **figura 19** mostra un resum del procés de diferenciació dels subtipus de cèl·lules T rellevants en la CU i les citocines efectores que produeixen.

Citocina	Nivells en la CU		Influència en la inflamació	Funció
	CU	Cèl·lules que la secreten		
IL-1 β	↑	Monòcits, neutròfils, macròfags	Pro-inflamatòria	Estimulació de cèl·lules T per secretar citocines pro-inflamatòries, indueix factors quimiotàctics, proliferació de les cèl·lules B. A nivell sistèmic, increment de la temperatura i de les proteïnes de fase aguda
IL-4		Th2	Anti-inflamatòria	Estimulació de la resposta humoral, inhibeix la secreció de citocines pro-inflamatòries (TNF- α , IL-6, IL-8), activació de macròfags M2 i diferenciació de cèl·lules Th2 i Th9
IL-5	↑	Th2		Disminució de l'activitat de les cèl·lules Th1 i la resposta immunitària cel·lular, estimulació de la maduració d'eosinòfils i basòfils i reclutament de neutròfils
IL-6	↑	DCs i macròfags,	Pro-inflamatòria	Diferenciació de cèl·lules Th17 i inhibició de la secreció de TNF- α
IL-8/ CXCL8	↑	Monòcits, DCs i macròfags	Pro-inflamatòria	Reclutament de granulòcits. Quimiotaxi
IL-9	↑	Th9, Th2	Pro-inflamatòria	Activació de mastòcits, neutròfils i eosinòfils, i incrementa l'expressió de proteïnes que reforcen les unions estretes en la barrera intestinal
IL-10	↑	Treg, Th2, Th17 i Breg	Anti-inflamatòria	Inhibició de la secreció de metal·loproteases, factor tissular, ciclooxigenasa 2 i de l'expressió d'NF- κ B. Activa macròfags M2
IL-13	↑	Th2	Anti-inflamatòria	Disminució de l'activitat de cèl·lules Th1 i la resposta immunitària cel·lular. Inhibició de la secreció de citocines pro-inflamatòries (TNF- α , IL-6, IL-1 β), influencia l'expressió de proteïnes creant unions estretes en la barrera epitelial intestinal i l'apoptosi cel·lular de cèl·lules epitelials. Activa macròfags M2
IL-17	↑	Th17, monòcits, neutròfils, T CD8 ⁺ , NK	Pro-inflamatòria	Estimulació de monòcits, cèl·lules epitelials i endotelials a secretar citocines pro-inflamatòries (TNF- α i IL-1 β) i quimiocines responsables de la migració de leucòcits i neutròfils cap als teixits inflamats, en absència de IL-23 suporta la funció de la barrera intestinal a través de la regulació d'occludina en les unions estretes
IL-21		Th17, Th2		Disminució de l'activitat de cèl·lules Th1 i la resposta immunitària cel·lular, incrementa l'expressió dels receptors de IL-23, estimula la proliferació i maduració de cèl·lules B, T CD8 ⁺ i NK
IL-22		Th17, Th22, Th1		Inducció de la secreció de pèptid anti-microbià, IL-10 i mucines i mediació dels processos de reparació tissular
IL-23	↑	Macròfags, DCs	Pro-inflamatòria	Diferenciació de cèl·lules Th17
IL-25		Th2		Disminució de l'activitat de cèl·lules Th1 i la resposta immunitària cel·lular

IL-33	Treg, macròfags, DCs, mastòcits		Increment de la secreció d'IL-4, IL-5 i IL-13, increment de l'acumulació de Th2, estimulació de la resposta patogènica del tipus Th2 i Th17, i inducció de la reparació tissular en coordinació amb les Treg
IL-35	Treg	Anti-inflamatòria	Supressió de la diferenciació de Th17
TGF- β	Treg	Anti-inflamatòria	Estimulació de la reparació epitelial disminuint l'expressió de IL-33 i Th22, estimulació de la diferenciació de Th17 en presència de IL-6 i Treg en absència de IL-6 i diferenciació de cèl·lules Th9
IFN- γ	Th1, DCs, macròfags		Increment de la transmissió i el transport paracel·lular, i activació de macròfags
TNF- α	↑ Th1, DCs, macròfags	Pro-inflamatòria	Juga un paper en l'apoptosi cel·lular, estimulació de limfòcits i activació d'altres cèl·lules immunitàries
CCL2 /MCP-1	↑ Monòcits i DCs	Pro-inflamatòria	Migració i infiltració de cèl·lules mononuclears en la làmina pròpia. Quimiotaxi
IP-10 /CXCL10	↑ Monòcits, cèl·lules endotelials i fibroblasts	Pro-inflamatòria	Quimiotaxi de monòcits i cèl·lules T, adhesió de cèl·lules T i angiogènesi

Taula 9. Influència de les citocines rellevants en la patogènesi de la CU

Adaptat de (259).

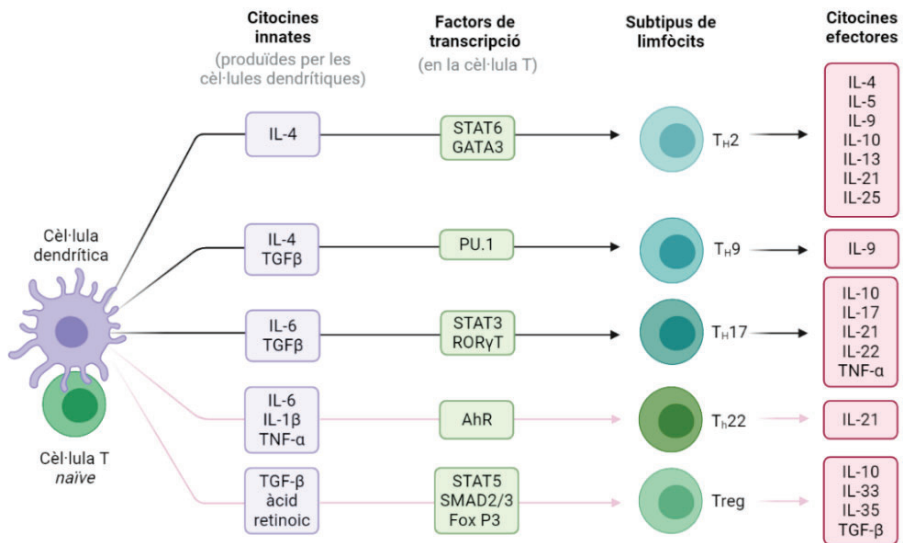


Figura 19. Vies de diferenciació de les cèl·lules T naïve en la CU

L'esquema representa les citocines produïdes per les cèl·lules dendrítiques inductores de la diferenciació de la cèl·lula T naïve, per presentació antigènica i producció de citocines innates que activen els factors de transcripció clau i diferencien els subtipus de limfòcits productors de citocines secundàries efectores de la resposta. Les línies i fletxes negres indiquen les vies de diferenciació predominants, mentre que les de color vermell clar indiquen les vies de diferenciació que es *downregulen* en la CU.

En la patogènesi de la CU, els limfòcits B també juguen un paper crucial. L'activació de les cèl·lules B intestinals té lloc en els nòduls limfàtics mesentèrics i en els teixits limfoides que es generen de forma ectòpica durant el transcurs de la malaltia, seguit de la seva diferenciació cap a cèl·lules plasmàtiques i la migració cap a la làmina pròpia intestinal. En la CU, el nombre de cèl·lules plasmàtiques en la làmina pròpia s'incrementa i mentre que en individus sans la major part són secretores d'IgA, en inflamació esdevenen secretores d'IgG. En condicions fisiològiques, la secreció local d'anticossos regula la composició de la microbiota i manté l'homeòstasi de la barrera intestinal però en la CU la síntesi d'anticossos contra la pròpia microbiota o els teixits (com els ANCA) es detecten en 2/3 dels pacients. De fet, en mostres de femta de pacients amb CU es detecten un 80% de bacteris intestinals opsonitzats amb anticossos, respecte el 10% que mostren els controls sans (260,261).

Tanmateix, en la CU s'observa una reducció de la població de Breg que condueix a una disminució de la concentració d'IL-10 en sang perifèrica i una pèrdua de les seves propietats immunoreguladores (262).

Tots els processos bioquímics, la disrupció de les unions estretes a nivell molecular, l'increment de la permeabilitat intestinal, l'apoptosi de les cèl·lules epitelials, la infiltració de cèl·lules inflamatòries i la producció de citocines i quimiocines en la mucosa condueix als canvis arquitectònics de les criptes i a la seva destrucció fins que les erosions i les ulceracions esdevenen macroscòpiques (263).

1.4.2.5 Classificació clínica

El diagnòstic de la CU es realitza en base a la història clínica i a les característiques clíniques, endoscòpiques i histològiques. La presència d'autoanticossos, com els ANCA pot ser útil en el diagnòstic precoç i en la seva diferenciació respecte la malaltia de Crohn (264). La presència d'inflamació contínua en el colon caracteritzada per eritema, granularitat, erosions, friabilitat, sagnat i ulceracions esdevenen un signe patognomònic en el diagnòstic endoscòpic, però la colonoscòpia amb biòpsia és l'única manera de realitzar un diagnòstic definitiu histopatològic, així com l'avaluació de la severitat i la identificació d'una possible displàsia. A nivell histològic, es poden

evidenciar canvis típics, com una distorsió de l'arquitectura de les criptes, una superfície mucosa irregular i una gran inflamació transmucosa difusa en absència de granulomes (265).

Adicionalment a la confirmació del diagnòstic, és important definir l'extensió i severitat de la inflamació, per orientar el tractament apropiat i predir el pronòstic de la malaltia. En aquest sentit, és crucial disposar de mesures objectives per guiar la pràctica clínica i predir l'evolució a llarg termini en aquests pacients. Existeixen al menys 10 sistemes de puntuació formulats per avaluar l'activitat de la malaltia, però els més utilitzats són l'índex de Montreal i la puntuació Mayo, que permeten una avaluació més objectiva i són utilitzats en els assajos clínics, tot i que no estan validats.

El **sistema de classificació de Montreal** (266) és útil per les seves implicacions en la patogènesi (correlaciona amb marcadors subclínic o genètics), en la teràpia (tipus de fàrmac i administració) i en el seu pronòstic (severitat de la malaltia, necessitat de colectomia, risc de càncer colorectal i mortalitat). Segons aquests criteris els pacients s'estratifiquen per l'extensió i localització de l'afectació en el colon o per l'activitat de la malaltia. En quant a la seva **extensió i localització** (Figura 20):

- Proctitis ulcerativa: extensió limitada a la zona del recte o fins a la unió recte-sigmoidea.
- Colitis distal o al costat esquerre: afectació limitada a la porció des del colon distal a l'angle esplènic.
- Extensa o pancolitis: s'estén més enllà de l'angle esplènic.

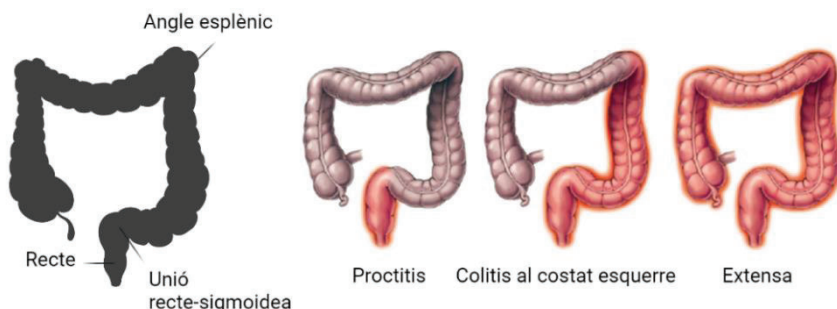


Figura 20. Classificació de Montreal segons extensió i localització de la CU

Introducció

La classificació de Montreal segons l'**activitat/severitat** de la malaltia divideix la CU en quatre categories basades en les manifestacions descrites per Truelove i Witts (267), i l'*American College of Gastroenterology* (268):

- CU en remissió: no mostra símptomes.
- CU lleu: quatre deposicions o menys diàries amb o sense sang, sense signes de toxicitat sistèmica i taxa de sedimentació d'eritròcits normal.
- CU moderada: més de quatre deposicions diàries amb signes mínims de toxicitat sistèmica.
- CU severa: més de sis deposicions diàries amb sang i nivell evident de toxicitat sistèmica amb febre ≥ 37.5 °C, taquicàrdia ≥ 90 pulsacions/min, hemoglobina < 10.5 g/dL o taxa de sedimentació d'eritròcits elevada ≥ 30 mm/h.

L'inconvenient més important d'aquesta classificació està associat a la naturalesa dinàmica de la malaltia, amb canvis en la distribució i severitat durant el temps.

El **sistema de puntuació Mayo** (269) s'utilitza rutinàriament per avaluar la severitat de la malaltia i monitoritzar els pacients durant el tractament. Utilitza característiques clíniques, valoració mèdica i característiques endoscòpiques per calcular una puntuació (**Taula 10**). Els valors tenen un rang de 0 a 12 punts, on els valors alts indiquen una malaltia més severa.

Índex avaluat	0	1	2	3
Freqüència de deposicions	Normal	1-2/dia més de l'habitual	3-4/dia més de l'habitual	5/dia més de l'habitual
Sagnat al recte	No	Fils hemàtics	Sagnat visible	Rectorràgia
Avaluació microscòpica de la mucosa	Normal	Friabilitat lleu	Friabilitat moderada i erosions	Sagnat espontani i ulceracions
Avaluació mèdica global	Normal	Lleu	Moderada	Severa

Taula 10. Criteris avaluats pel sistema de puntuació Mayo en la CU

Adaptat de (265).

Aquesta mesura però presenta algunes mancances, la més important de les quals és la falta d'acord entre observadors, el que ha impedit la seva validació malgrat el seu ús extensiu i les contínues modificacions.

1.4.2.6 Tractament actual

Arrel de la introducció dels fàrmacs biològics, el tractament per la CU ha passat de tractar els símptomes i mantenir el períodes de remissió a tenir l'objectiu de regenerar la mucosa, modificant la història natural de la malaltia i millorant els resultats a llarg termini (270). De fet, assolir la regeneració de la mucosa té una rellevància crucial en el pronòstic de la CU, amb menys incidència de recaiguda clínica, de necessitat d'hospitalització i cirurgia (colectomia), de l'ús de corticoesteroides, així com de taxes reduïdes de displàsia i càncer colorectal. Per això, els plans de tractament es centren en disminuir la inflamació i promoure la reparació epitelial.

En aquest sentit, són necessàries unes definicions consensuades d'aquests termes, utilitzant una combinació de conceptes endoscòpics i histològics com a punt final desitjable en els pacients de CU. Així, mentre que la **remissió** es defineix com cessament del sangat rectal amb millora intestinal i regeneració a nivell endoscòpic, amb puntuació Mayo de 0 o 1; la **reparació completa** de la mucosa es defineix com l'absència de friabilitat, sang, erosions i úlceres en tots els segments de la mucosa intestinal (271) amb una puntuació Mayo de 0 (272).

En els casos de remissió endoscòpica, la inflamació histològica pot persistir i pot estar associada amb un pitjor pronòstic. Així, tot i que l'endoscòpia es manté com un punt clau en la monitorització del dany; amb les eines d'avaluació desenvolupades recentment, la recuperació de la mucosa a nivell histològic té el potencial d'esdevenir un objectiu terapèutic malgrat la complexa heterogeneïtat de la malaltia (273).

Els aminosalicilats i els corticoesteroides són els fàrmacs més prescrits en el tractament de la CU i actuen reduint la inflamació de la mucosa controlant l'expressió de la via NF-κB i de citocines pro-inflamatòries (modulant la migració i proliferació cel·lular) (274–276):

- **Aminosalicilats:** com l'àcid 5-aminosalicílic o la mesalamina estan indicats per tractar la CU lleu i moderada. Presenta eficàcia en la inducció i manteniment de l'estat de remissió clínic en un 37% dels pacients per via oral i un 50.3% per via tòpica (277) i l'assoliment de la reparació de la mucosa s'incrementa en la teràpia

combinada. Els efectes adversos provocats, com nàusees, dolor abdominal, diarrea i mal de cap, són generalment lleus.

- **Corticoesteroides:** com la prednisolona, és el tractament d'elecció per pacients que no responen a la mesalamina. Es prescriuen per induir l'estat de remissió en pacients amb CU activa de lleu a moderada però no presenten eficàcia en el manteniment de la remissió. L'ús de corticoesteroides orals sistèmics presenta nombrosos efectes secundaris com infeccions oportunistes, diabetis de tipus II, hipertensió, efectes oculars, tromboembòlies i osteoporosi. Per aquest motiu s'utilitzen els corticoesteroides orals de segona generació, com la budesonida amb millor perfil de tolerància i seguretat, ja que consisteixen en càpsules pH-dependents, restringint el seu alliberament a l'íleon distal i al colon ascendent (278).

D'entre els **immunosupressors** s'inclouen les tiopurines, el metrotexat, inhibidors de la calcineurina i inhibidors de la quinasa Janus (JAK).

- Els estudis en pacients de CU que avaluen l'ús de tiopurines (azatioprina i 6-mercaptopurina) i l'ús del metrotexat són escassos. L'azatioprina, que redueix els infiltrats inflamatoris en la mucosa intestinal, induint l'apoptosi i limitant la proliferació d'aquestes cèl·lules (276), té un efecte beneficiós en la inducció de la reparació de la mucosa (279) i redueix les taxes d'hospitalització però presenta greus efectes adversos que condueixen al seu abandonament en un 39% dels casos (280).
- Els inhibidors de la calcineurina, com la ciclosporina A i el tacrolimus redueixen la presència de cèl·lules secretores de TNF- α en la mucosa intestinal i presenten un efecte en la immunitat mediada per cèl·lules T i B (276). Aquests han mostrat resultats satisfactoris disminuint l'índex d'activitat de la malaltia en pacients amb CU aguda severa refractària als corticoesteroides (281,282). En el cas del tacrolimus, amb un efecte immunosupressor incrementat, el seu ús condiciona a presentar greus efectes adversos com afectació de la funció renal i malalties infeccioses, pel que s'ha de considerar en la pràctica clínica.

- Inhibidors de JAK: interaccionen amb la cadena γ de sis receptors de citocines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21) amb rols crucials en la limfopoesi (283). El tofacitinib per via oral s'ha aprovat per al tractament de la CU activa de moderada a severa tot i que la seva seguretat a llarg termini no està clara i els efectes adversos principals són infecció per virus herpes zòster i trombosi (284).

Fins a la data, d'entre els **tractaments biològics** aprovats, els agents anti-TNF- α han mostrat l'evidència més robusta en quant a la seva eficàcia en l'assoliment de la reparació mucosa. En aquest grup també trobem els inhibidors de citocines pro-inflamatòries anti-IL-12/23 i els anti-integrina- $\alpha 4\beta 7$.

- El tractament amb **inhibidors de TNF- α** (infliximab, adalimumab i golimumab) està reservat per als casos de CU moderada a severa o que no responen al tractament convencional. Aquests actuen a diferents nivells del dany a la mucosa, restringint la infiltració inflamatòria, la proliferació de cèl·lules T en la làmina pròpia i disminueixen l'expressió de molècules pro-inflamatòries. Tanmateix, actuen en el procés de regeneració de la mucosa reforçant la barrera epitelial (276). La utilització d'aquests fàrmacs ha permès mantenir durant llargs períodes de temps la remissió de la malaltia i modificar el seu curs en una fracció important de pacients. Malgrat això, el desenvolupament d'immunogenicitat, amb la producció d'anticossos contra el fàrmac, resulta en un aclariment accelerat i una reducció de la seva vida mitja, que correlaciona amb una pèrdua de resposta clínica (285). De fet, en assajos clínics es va observar fins un 40% de no responedors primaris, i un 23-46% de no responedors secundaris després d'un any de tractament (286), posant de manifest la usual interrupció del tractament per no resposta o efectes adversos i la necessitat de fer-ho servir en intervals de temps curt o en teràpia combinada.
- La teràpia amb **anti-IL12/23** es reserva per als casos moderats i severos. L'ustekinumab presenta eficàcia en la inducció i manteniment de la remissió clínica. Addicionalment, es millor opció per a pacients d'edat avançada amb un risc incrementat d'infeccions i malignitat (287). La seguretat en comparació amb

els anti-TNF- α és més elevada considerant que no s'ha d'utilitzar en combinació amb immunosupressors degut a les taxes baixes d'immunogenicitat.

Actualment, la decisió de quin biològic s'ha de fer servir inicialment s'acostuma a prendre en funció de l'experiència clínica, les preferències dels pacients i les condicions de comorbiditat, així com el cost. Mentre que els agents anti-TNF- α romanen com a primera línia de biològics fets servir per la majoria de pacients amb CU moderada i severa, l'ustekinumab hauria de considerar-se d'igual manera o en segona línia, donada la seva eficàcia i perfil de seguretat (288).

- La teràpia amb **vedolizumab**, que inhibeix específicament la unió de la integrina- $\alpha 4\beta 7$ amb MadCAM-1 evita la infiltració leucocitària del teixit intestinal, alleujant la inflamació local intestinal. Els assajos clínics de fase III han mostrat la seva eficàcia en la inducció i manteniment de la remissió amb gran tolerància i seguretat, i el seu ús s'ha aprovat en Europa i Estats Units per a pacients adults amb CU moderada a severa que no presenten resposta o presenten tolerància a la teràpia convencional o als anti-TNF- α .

El règim farmacològic s'ha de planificar d'acord amb la severitat del brot, l'extensió i l'evolució de la malaltia, la freqüència de recaiguda, la medicació prèvia i la resposta presentada als fàrmacs, així com els efectes secundaris, fins assolir la recuperació total de la mucosa, el que pot resultar complex. Amb aquest propòsit, existeixen unes guies establertes però en constant renovació, com és el cas de l'elaborada per la Organització Europea de Crohn i Colitis (ECCO) (289).

Actualment, tot i el progrés significatiu que s'ha fet en el tractament, amb diferents dianes terapèutiques, la proporció de pacients amb CU refractària a cadascun dels tractaments durant la fase d'inducció persisteix en un 30-55% (290), aproximadament 2/3 dels pacients amb CU moderada a severa no aconsegueixen la recuperació de la mucosa després del tractament (276) i 1/3 dels pacients amb recuperació de la mucosa a nivell endoscòpic, presenten malaltia persistent per avaluació histològica (291), el que insta als investigadors a explorar activament altres teràpies.

Adicionalment, són necessàries més dades clíniques sobre la seguretat a llarg termini dels fàrmacs disponibles.

Finalment, les indicacions per realitzar cirurgia inclouen sagnat massiu, perforació intestinal i carcinogènesi, mentre que només es suggereix si es tracta de pacients amb CU severa que no responen al tractament i/o presenten reaccions secundàries que afecten de forma greu la qualitat de vida, establint la taxa de cirurgia en un 7.5% (292).

1.4.2.7 Models murins experimentals de CU

Des de l'any 1993, quan es van establir els 3 models genèticament modificats d'inflamació intestinal espontània, on s'inclouen el *knockout* per *Il10*, el *knockout* per *Il2* i el *knockout* per a la cadena α del TCR, s'han desenvolupat més de 66 tipus de models animals d'inflamació intestinal classificats en models genèticament modificats, per transferència adoptiva de cèl·lules T, químicament induïts i models espontanis, proveint d'importantes contribucions no només en l'enteniment dels mecanismes bàsics de la malaltia, també en el desenvolupament d'intervencions terapèutiques (293,294).

Els models genèticament modificats han permès analitzar la influència de la sobreexpressió o deficiència de gens que esdevenen factors patogènics o reguladors en el desenvolupament de la colitis crònica. Així, tot i que la inflamació intestinal que s'observa en aquests models no replica amb exactitud el desenvolupament de la malaltia en humans, si permet reproduir alguns trets característics. D'entre aquests, el model murí MDR1, que presenta una pèrdua d'expressió de *Mdr1a*, un locus de risc per a la CU també en humans, mostra defectes en la funció de la barrera intestinal per incapacitat d'eliminar els productes bacterians de les cèl·lules epitelials, provocant un increment de la presentació antigènica i la hiperactivitat de les cèl·lules T, amb característiques histològiques semblants a les de la CU humana (295).

D'entre els models amb CU induïda químicament, que són els més utilitzats degut a que la inducció és immediata i relativament senzilla, trobem el model induït per dextrà sulfat sòdic (DSS), que tractarem en detall a continuació i s'utilitzarà en aquesta tesi, i els models induïts per administració intrarectal d'àcid 2,4,6-trinitrobenzenosulfònic

(TNBS) i d'oxazolona (296). Aquests models són els més adequats per identificar els mecanismes immunològics/biològics de les diferents fases: aguda, remissió i crònica. El model de TNBS és més adequat per a l'estudi de la malaltia de Crohn ja que presenta una inflamació transmural severa induïda per Th1/Th17, mentre que el model induït amb oxazolona condueix a una ulceració superficial de l'epiteli en la part distal del colon amb una resposta Th2 mediada per IL-4 i una intensa producció de IL-13, tot i que la mortalitat en aquest model és elevada.

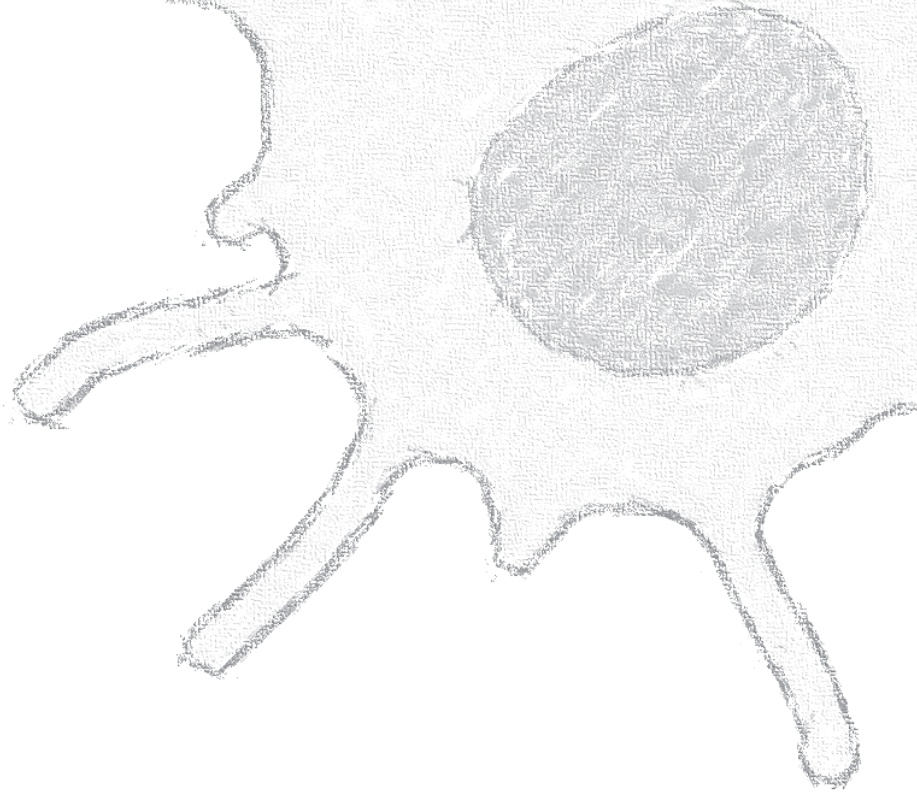
El model de transferència adoptiva de cèl·lules T CD4⁺ *naïve* aïllades del fetge d'un ratolí *wild type* a un ratolí immunodeficient *scid* resulta en el desenvolupament de pancolitis entre 5 i 8 setmanes després de la transferència de cèl·lules. Es pot observar inflamació transmural i desenvolupament de cèl·lules Th1 i Th17, pel que, com el model induït per TNBS, és un model més apropiat per a l'avaluació terapèutica de la malaltia de Crohn (297).

Finalment, d'entre els models espontanis, els ratolins C3H/HeJBr presenten una mutació *missense* en el tercer exó del gen *Tlr4* i desenvolupa inflamació espontània en el cec i el colon a les 3-6 setmanes (298) i el model SAMP1/YitFc desenvolupa un fenotip representatiu de la malaltia de Crohn amb inflamació en l'íleon a les 10 setmanes d'edat, mediada per una resposta de tipus Th1 i caracteritzada per uns nivells elevats d'IFN- γ i TNF- α (299).

1.4.2.7.1 CU induïda per DSS

Un dels models experimentals més utilitzats per avaluar el nivell d'inflamació intestinal en ratolins és el model de CU induïda per DSS (300). El DSS és un polisacàrid sulfatat tòxic per a l'epiteli del colon que causa dany a les cèl·lules epitelials i una resposta immunitària que altera la funcionalitat de la barrera mucosa intestinal. L'aplicació d'un 2% al 5% (pes/volum; p/v) de DSS afegit en l'aigua per beure durant 4-7 dies, seguit de l'administració d'aigua pot induir inflamació aguda limitada a la zona del colon i caracteritzada per erosions/úlceres, depleció parcial de les criptes, pèrdua de les cèl·lules de Goblet i infiltració de cèl·lules immunitàries innates, principalment neutròfils en la mucosa i submucosa en la part més distal del colon (301). Durant els primers 3

dies d'administració el pes s'incrementa i comença a disminuir els dies posteriors, coincidint amb l'inici del sagnat. Quan l'administració de DSS finalitza, s'indueix gradualment la recuperació de la mucosa. Aquesta inflamació induïda però, es pot cronificar alternant cicles de DSS i aigua (o DSS a una concentració mínima), reflectint la naturalesa de remissió i recaiguda pròpia de la malaltia (302). L'estat inflamatori que s'indueix en aquest model és particularment sever a nivell del colon distal i comparteix moltes característiques fenotípiques, incloent pèrdua de pes, diarrea i sang present en les deposicions, però també immunològiques i histològiques, amb la CU humana.

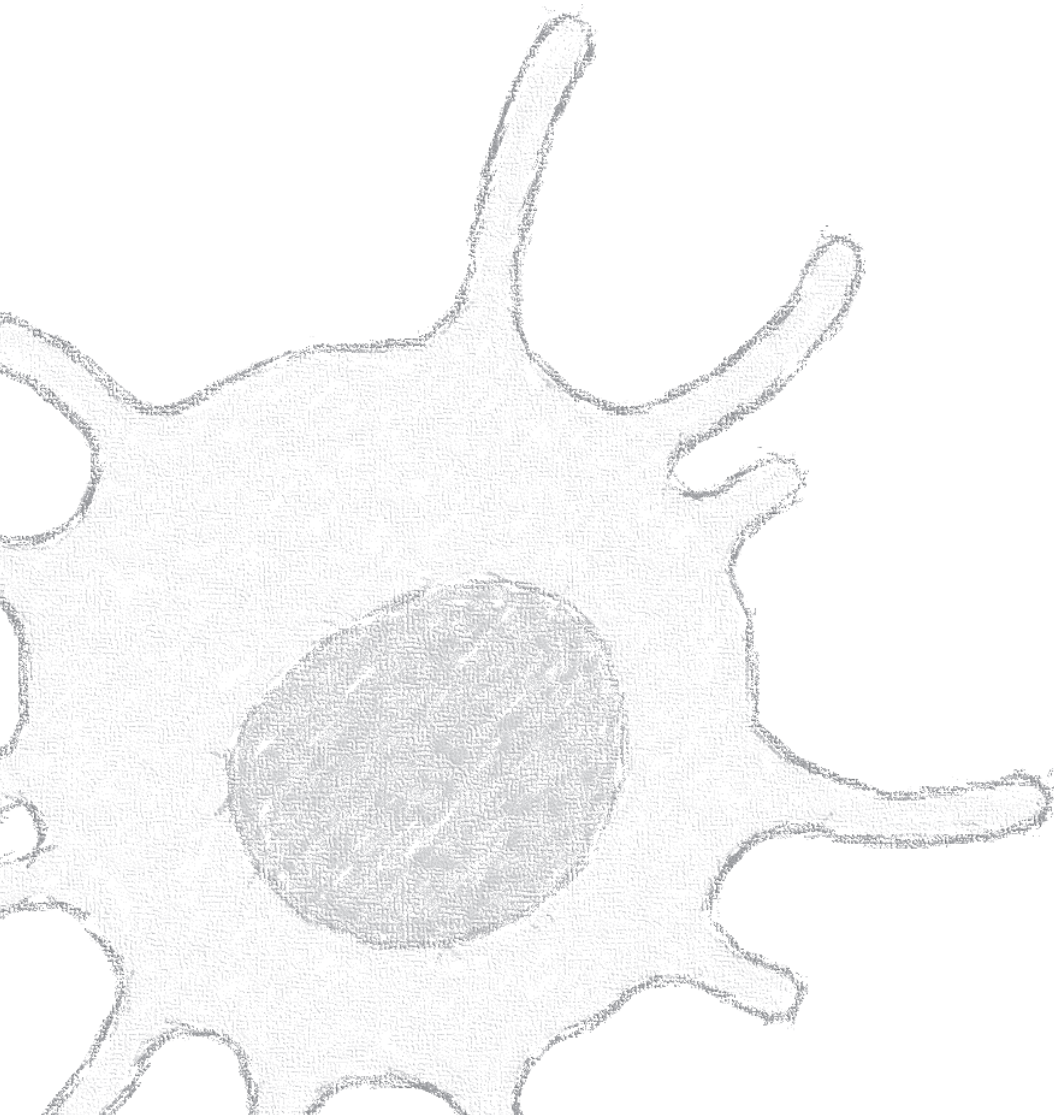


2. OBJECTIUS

Les característiques immunomoduladores induïdes per la proteïna plasmàtica humana C4BP(β -) en el model *in vitro* de Mo-DCs inflamatòries li confereixen potencial terapèutic per al restabliment de la tolerància immunològica i la prevenció o mitigació del dany tissular en malalties autoimmunitàries i inflamatòries. Per això, els objectius d'aquesta tesi són:

1. Avaluar el potencial terapèutic de C4BP(β -) com a tractament *in vivo* en processos immune-inflamatoris. Per assolir aquest objectiu:
 - Avaluar l'eficàcia terapèutica de C4BP(β -) en els models experimentals de LES amb NL, NZBW F1 i MRL-lpr.
 - Avaluar l'eficàcia terapèutica de C4BP(β -) en el model experimental de CU aguda induïda per DSS.
2. Disseccionar i caracteritzar l'activitat no canònica immunomoduladora de C4BP(β -) generant una nova variant recombinant (PRP6-HO7), basada en la seva estructura però composta exclusivament pel domini immunomodulador CCP6, per avaluar la seva independència funcional i el seu potencial respecte C4BP(β -) en la inducció de tolerogènesi sobre els fagòcits mononuclears i com a tractament en processos immune-inflamatoris.

3. METODOLOGIA



3.1 Models murins de LES amb NL

3.1.1 Obtenció i purificació de C4BP(β^+), C4BP(β^-) i rC4BP(β^-)

Per a la realització dels estudis en ratolins que es detallen en aquesta tesi es van utilitzar les proteïnes següents:

- Isoforma de C4BP plasmàtica amb cadena β (C4BP(β^+)): correspon a la isoforma majoritària $\alpha 7\beta 1$ purificada de plasma humà i es troba unida a PS, formant el complex C4BP(β^+)-PS.
- Isoforma de C4BP plasmàtica sense cadena β (C4BP(β^-)): correspon a la isoforma minoritària $\alpha 7\beta 0$ purificada de plasma humà.

Aquestes dues proteïnes plasmàtiques, C4BP(β^+) i C4BP(β^-), es van purificar de plasma humà del banc de sang local utilitzant precipitació amb BaCl_2 (303,304), seguida de quatre etapes seqüencials de cromatografia: cromatografia amb heparina, cromatografia d'interacció hidrofòbica (butil), cromatografia d'intercanvi d'anió (sefarosa Q) i finalment, cromatografia per exclusió de mida (Superdex).

- Isoforma de C4BP sense cadena β recombinant (rC4BP(β^-)): correspon a $\alpha 6\beta 0$ i està produïda en cèl·lules eucariotes HEK293 (Expi293).

La seqüència de la cadena α corresponent a rC4BP(β^-) va ser clonada en el vector d'expressió pcDNA3.1(+) (ThermoFisher, Waltham, MA). El DNA plasmídic es va amplificar i es va purificar utilitzant el *kit Qiafilter Plasmid MegaKit* (Qiagen, Hilden, Alemanya). Les cèl·lules HEK293 (Expi293) (ThermoFisher) es van créixer en suspensió fins que es va assolir el volum de cultiu cel·lular desitjat amb 2.5×10^6 cèl·lules/ml i un 98% de viabilitat. Les cèl·lules es van transfectar amb 1 mg de DNA per litre de cultiu i després es van incubar durant 7 dies a 37°C , amb agitació a 125 rpm i un 8% de CO_2 . Finalment, es va recollir el medi de cultiu i es va centrifugar durant 30 minuts a 6000 g i 4°C . El sobrenedant es va utilitzar per purificar la proteïna. La purificació de rC4BP(β^-) es va realitzar en quatre etapes seqüencials: cromatografia amb heparina, cromatografia d'interacció hidrofòbica (butil), cromatografia d'intercanvi d'anió (sefarosa Q) i finalment per cromatografia per exclusió de mida (Superdex) d'acord amb els protocols de Bioingenium (Bioingenium, Barcelona, Espanya).

Tant les proteïnes purificades de plasma (C4BP(β +) i C4BP(β -)) com rC4BP(β -), van ser concentrades, dialitzades i resuspeses en tampó fosfat salí (PBS) a pH 7.4.

3.1.1.1 SDS-PAGE i tinció Coomassie Blue

La puresa de les glicoproteïnes plasmàtiques C4BP(β +) i C4BP(β -) es va avaluar per electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) de Tris-Acetate amb gradient del 3-8% (*NuPAGE precast protein gels*; ThermoFisher) amb 6 μ g de proteïna/carril en condicions reductores i no reductores, i posteriorment els gels es van submergir en tinció *Blue Safe* (NZYTech, Lisboa, Portugal) durant 15 minuts i es van destenyir en aigua.

3.1.2 Generació de BM-DCs

Els fèmurs i túbies de ratolins femelles BALB/c de 14 setmanes (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) es van netejar dels teixits subjacents mitjançant gasses estèrils. Els ossos obtinguts es van deixar en medi RPMI1640 (Gibco, ThermoFisher). Posteriorment, es van desinfectar en etanol al 70% (volum/volum; v/v) i es van tallar les apòfisis. Amb una xeringa d'insulina i una agulla de 25 G es va introduir medi a través de l'os per obtenir la medul·la òssia, que es va dipositar sobre un *cell strainer* (BD Biosciences, Bedford, MA) per obtenir una suspensió de cèl·lules individuals i uniforme. Les cèl·lules es van comptar amb càmera de Neubauer i 10^6 cèl·lules vives obtingudes de la medul·la òssia es van resuspendre en 2 ml de RPMI1640 suplementat amb 100 mg/ml d'estreptomicina, 100 IU/ml de penicil·lina, L-glutamina a 10 mM (totes de Gibco, ThermoFisher) i un 10% (v/v) de sèrum fetal boví inactivat (FBSi) (Life Technologies, ThermoFisher) (medi complet) i es van sembrar i cultivar en plaques de 60-mm a 37°C i 5% de CO₂. Les BM-DCs es van generar afegint al medi factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags recombinant de ratolí (rmGM-CSF) (20 ng/ml) (Peprtech, Londres, Regne Unit) a dies 0, 3 i 6 de cultiu. C4BP(β -) es va afegir a 5 μ g/ml a dies 0 i 3 de cultiu cel·lular. A dia 6, les cèl·lules no adherents es van cultivar en plaques de 24 pous a 5×10^5 cèl·lules/ml i es van estimular amb 10 μ g/ml de gardiquimod (InvivoGen, San Diego, CA), agonista de TLR7, durant 24h.

3.1.3 Citometria de flux

Per analitzar el fenotip de superfície cel·lular es van utilitzar els anticossos anti-CD80 conjugat amb fluoresceïna (FITC) (16-10A1) i anti-CD86 conjugat amb ficoeritrina (PE) (PO3.3) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanya). Després de rentar amb PBS, les cèl·lules es van marcar amb 3 µl dels anticossos monoclonals (mAbs)/10⁵ cèl·lules en 100 µl de tampó FACS (1% (p/v) d'albúmina sèrica bovina (BSA) i 0.1% (p/v) d'azida sòdica en PBS) durant 15 minuts a temperatura ambient.

Per excloure residus cel·lulars, les BM-DCs es van seleccionar segons el paràmetres de *forward scatter* (FSC), que permet seleccionar les cèl·lules segons la seva mida i *side scatter* (SSC), que permet la selecció de les cèl·lules segons la seva complexitat interna. També es va fer servir marcatge amb 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (ThermoFisher) per comprovar la viabilitat cel·lular. Les cèl·lules marcades es van analitzar utilitzant el citòmetre de flux FACSCanto II equipat amb el *software* FACSDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Els anàlisis posteriors es van fer amb el *software* FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR).

3.1.4 Proteïnes i fàrmacs

Les proteïnes utilitzades com a tractament en els diferents grups experimentals van ser: C4BP(β⁺), C4BP(β⁻) o rC4BP(β⁻) segons s'especifica. Totes les proteïnes utilitzades en els estudis estaven lliures d'endotoxina, com es va comprovar pel mètode del lisat d'amebòcits de *Limulus* (GenScript, Piscataway, NJ).

La ciclofosfamida (CYP) (Genoxal[®], Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfallen, Alemanya), utilitzada com a tractament de referència, es va resuspendre en solució salina fisiològica i va ser administrada a una dosi de 2.5 mg en un volum final de 0.13 ml.

3.1.5 Disseny experimental

En aquests estudis es van utilitzar ratolins femella NZBW F1 i MRL-lpr (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Ambdós models desenvolupen una malaltia autoimmunitària espontània similar al LES en humans.

Metodologia

En el primer estudi, es van utilitzar 24 ratolins femella NZBW F1 (8 animals per grup) amb 6 mesos d'edat (30-35 g/ratolí). C4BP(β -) va ser administrada intraperitonealment durant tres mesos (entre els sis i els nou mesos d'edat) a 0.5 mg/ratolí dues vegades a la setmana. CYP va ser administrada també intraperitonealment a 2.5 mg/ratolí cada 10 dies. Finalment, es va establir un grup control tractat amb PBS amb la mateixa pauta d'administració que C4BP(β -) (**Figura 21**). Mensualment es van monitoritzar i analitzar els nivells de proteïnúria fins al sacrifici dels animals, a la setmana 36.

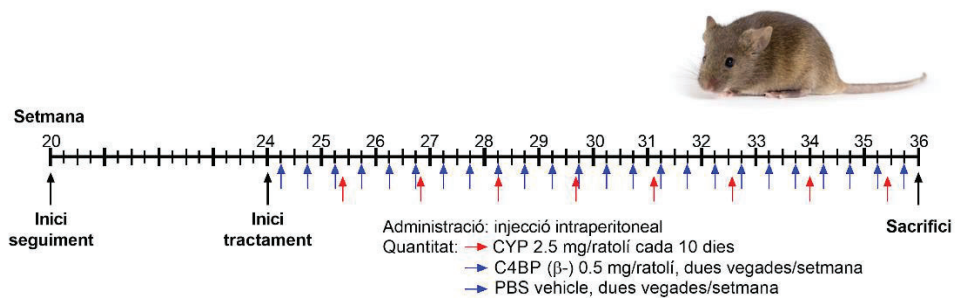


Figura 21. Pauta de tractament en el model murí de LES NZBW F1 per a l'avaluació del potencial de C4BP(β -)

Esquema de la pauta d'administració per la injecció intraperitoneal de la proteïna homo-oligomèrica d'unió a C4b (C4BP(β -)) i el tractament vehicle (PBS) (fletxes blaves) i ciclofosfamida (CYP) (fletxes vermelles) en el model animal de LES NZBW F1.

En el segon estudi, es van utilitzar també 24 ratolins femella NZBW F1 (8 animals per grup) amb 6 mesos d'edat (30-35 g/ratolí). La proteïna rC4BP(β -) es va administrar per via subcutània durant tres mesos a 0.05 mg/ratolí una vegada cada dues setmanes. CYP va ser administrada intraperitonealment a 2.5 mg/ratolí cada 10 dies, seguint el mateix patró d'administració que en el primer estudi. Finalment, es va establir un grup control que va ser tractat amb PBS seguint el mateix patró d'administració subcutània que el grup rC4BP(β -) (**Figura 22**).

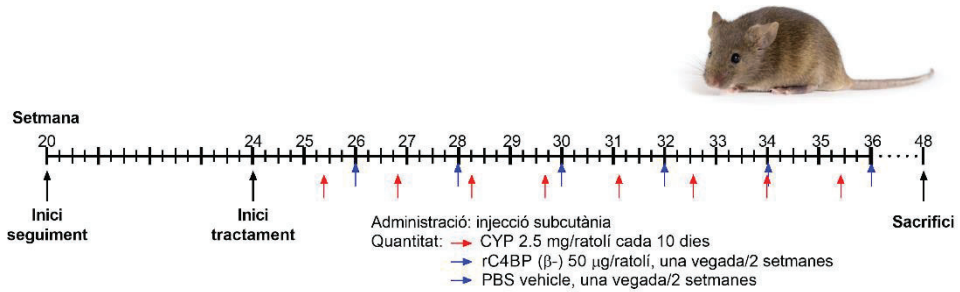


Figura 22. Pauta de tractament en el model murí de LES NZBW F1 per a l'avaluació del potencial de C4BP(β-) a dosi baixa

Esquema de la pauta d'administració per la injecció subcutània de rC4BP(β-) i PBS (fletxes blaves) i CYP (fletxes vermelles) en el model animal de LES NZBW F1.

En el tercer estudi, es van utilitzar 24 ratolins femella NZBW F1 (8 animals per grup) de 6 mesos d'edat, amb un pes de 35-40 g cada ratolí i 20 ratolins MRL-lpr (6-8 animals per grup) de 2.5 mesos d'edat amb un pes de 25-30 g.

En aquest cas, els ratolins NZBW F1 van ser tractats amb 100 µg setmanals de les isoformes de C4BP (C4BP(β+) i C4BP(β-)) intraperitonealment durant tres mesos (entre el sisè i el novè mes d'edat) (Figura 23).

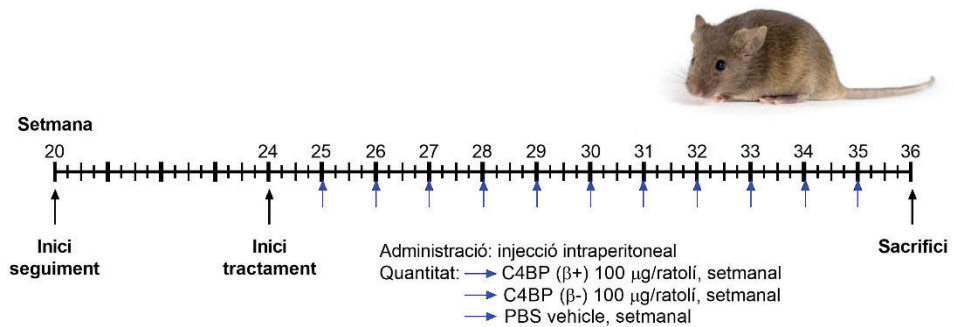


Figura 23. Pauta de tractament en el model murí de LES NZBW F1 per a l'avaluació de l'efecte de l'administració de C4BP(β+)

Esquema de la pauta de tractament per la injecció intraperitoneal de C4BP(β+), C4BP(β-) i PBS (fletxes blaves) en els ratolins NZBW F1.

Metodologia

Els ratolins MRL-lpr es van tractar entre els 2.5 i 5.5 mesos d'edat amb la mateixa pauta d'administració que el model NZBW F1 per a C4BP(β -) (n=6), amb 100 μ g una vegada per setmana, i CYP (n=6) que va ser administrada també intraperitonealment a 2.5 mg/ratolí cada 10 dies, seguint el mateix patró d'administració que els estudis anteriors (Figura 24). Finalment, es va establir un grup control, en tots dos models, que va ser tractat amb PBS (n=8) per la mateixa via i seguint el mateix patró d'administració que el grup C4BP(β -).

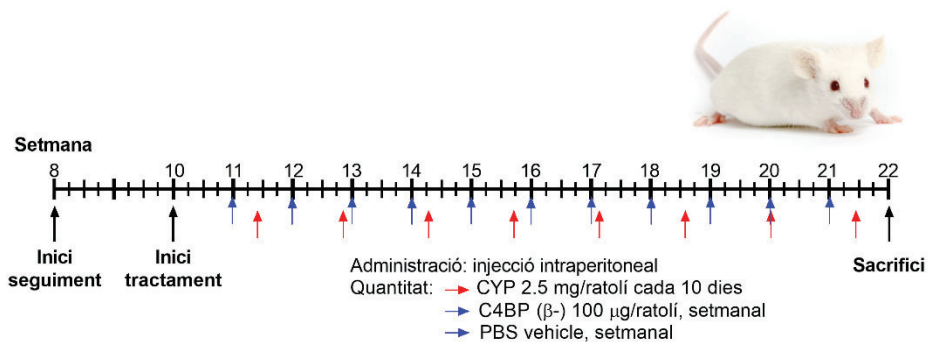


Figura 24. Pauta de tractament en el model murí de LES MRL-lpr per a l'avaluació del potencial de C4BP(β -)

Esquema de la pauta de tractament per la injecció intraperitoneal de C4BP(β -) i PBS (fletxes blaves) i CYP (fletxes vermelles) en els ratolins MRL-lpr.

Els animals es van mantenir sota condicions estàndard de laboratori, a 20-24°C i un 40-70% d'humitat relativa amb cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor. Es van alimentar amb una dieta estàndard i aigua *ad libitum*.

La dosi de C4BP(β -) per a la seva administració en models *in vivo* es va determinar en base a estudis previs on s'havien fet servir proteïnes relacionades amb el sistema de complement en models murins de patologies immune-inflamatòries (304–306). De la mateixa manera, l'inici del tractament amb C4BP(β +) i C4BP(β -) es va establir a les 24 setmanes d'edat perquè s'ha reportat que a les 23 setmanes d'edat, tot i que histològicament no es mostren característiques anòmales, els ratolins NZBW F1 ja presenten una tinció difusa en els glomèruls renals amb anti-IgG i una expressió incrementada de diferents marcadors inflamatoris (307). De forma anàloga, a l'inici del

tractament amb C4BP(β^-), els ratolins MRL-lpr de 10 setmanes d'edat ja presenten hipocomplementèmia, indicant nivells elevats d'ICs i un estat actiu de la malaltia (308).

No es va observar toxicitat ni canvis de comportament en els ratolins com a conseqüència de l'administració de C4BP(β^+), C4BP(β^-) ni CYP.

El pes corporal es va determinar de forma bimensual (NZBW F1) o setmanalment (MRL-lpr) des de l'inici de l'estudi fins al final del seguiment.

En els ratolins MRL-lpr, les lesions cutànies macroscòpiques de la regió interescapular, el musell i les orelles es van puntuar setmanalment de forma semi-quantitativa utilitzant una puntuació de 0 a 4: 0, sense canvis visibles en la pell; 1, pèrdua de pèl lleu amb envermelliment i algunes lesions disperses; 2, envermelliment i pèrdua de pèl en un àrea $<0.5 \text{ cm}^2$; 3, envermelliment, crostes i lesions amb un àrea total >0.5 , però $<1.0 \text{ cm}^2$; i 4, envermelliment, crostes i lesions amb un àrea total $>1.0 \text{ cm}^2$.

Tanmateix, els ratolins es van introduir 24 hores en gàbies metabòliques per recollir les mostres d'orina abans de començar el tractament i posteriorment de forma mensual (NZBW F1) o dues vegades per setmana (MRL-lpr) i van ser congelades a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. De forma intercalada, mensualment es van recollir mostres de sang obtingudes a partir de la vena de la cua i en el sacrifici a partir de la vena cava. La sang recollida en tubs Microtainer[®] (Becton Dickinson) es va deixar 30 minuts a temperatura ambient i posteriorment els tubs es van centrifugar a $11\,000 \text{ g}$ durant 2 minuts. Els sèrums obtinguts es van congelar a -80°C .

Al final de l'estudi, els ronyons es van disseccionar en tres parts i van ser processats per a l'anàlisi histològic, bioquímic i molecular. Dues parts es van guardar en paraformaldehid al 4%, una per ser processada en parafina i l'altra per realitzar inclusió en OCT (Sakura[®] Finetek, Alphen aan den Rijn, Països Baixos). La part central es va submergir en 1 ml d'*RNA later* (Qiagen) per ser congelada a -80°C .

Tots els experiments es van realitzar d'acord amb la legislació europea vigent per al treball amb animals d'experimentació i van ser aprovats pel Comitè Ètic

d'Experimentació en Animals (CEEA) (protocol nº 8765), el Comitè d'Ètica de la Universitat de Barcelona per a la recerca amb animals i la Generalitat de Catalunya (DARP:8765).

3.1.6 Detecció d'anticossos anti-C4BP(β -) humana

Per avaluar el desenvolupament d'anticossos contra la proteïna rC4BP(β -) humana administrada en els ratolins NZBW F1, es va realitzar un assaig per immunoadsorció lligat a enzims (ELISA) indirecte. Es va immobilitzar rC4BP(β -) (200 ng/100 μ l/pou, dissolta en tampó Na₂CO₃/NaHCO₃ a 100 mM i pH 9.6) per adsorció directa en una placa de 96 pous durant tota la nit a 4°C. Posteriorment, la placa es va bloquejar amb Tris-Tween (Tris a 50 mM i pH 7.4 amb NaCl a 150 mM i 0.2% (v/v) de Tween 20) amb un 1% (p/v) de BSA (100 μ l/pou) durant 1 hora a temperatura ambient. Els sèrums recollits dels ratolins es van diluir 1:500 en Tris-Tween amb un 1% (p/v) de BSA i es van incubar per duplicat en la placa (100 μ l/pou) durant 1.5 hores a temperatura ambient. Els anticossos específics contra rC4BP(β -) humana es van detectar per incubació amb un anticòs secundari policlonal de cabra anti-IgG de ratolí conjugat amb *horseradish peroxidase* (HRP) (P0447, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en una dilució 1:10 000 en Tris-Tween amb un 1% (p/v) de BSA durant 30 minuts a temperatura ambient. Els rentats es van realitzar amb Tris-Tween. Finalment, la placa es va revelar amb el substrat per HRP, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), i la reacció es va aturar amb àcid sulfúric (1N, H₂SO₄). Les absorbàncies es van llegir a 450 nm i 560 nm en l'espectrofotòmetre Victor X5 (PerkinElmer, Waltham, MA). Els sèrums de ratolins tractats amb CYP i PBS es van incloure com a controls negatius.

3.1.7 Anàlisi de la funció renal: proteïnúria, albuminúria i BUN

L'avaluació dels nivells de proteïnúria i albuminúria en les mostres d'orina es van sol·licitar al Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (Cerdanyola del Vallès, Espanya). Així, la quantitat de proteïna total en orina de 24 hores es va determinar pel mètode del vermell de pirogal·lol i molibdat en el qual les proteïnes de l'orina reaccionen amb aquest compost en medi àcid formant un complex de color blau/lila que es quantifica per espectrofotometria, amb màxima

absorbància a 600 nm (Olympus Autoanalyzer AU400, Hamburg, Alemanya). L'albúmina en orina de 24 hores es va determinar utilitzant un *kit* comercial d'ELISA (Active Motif, Carlsbad, CA) d'acord amb les instruccions del fabricant.

Els nivells de nitrogen procedent de la urea presents en sang (BUN), es van analitzar en el sèrum obtingut dels ratolins NZBW F1 utilitzant un *kit* enzimàtic comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que produeix una reacció colorimètrica que s'analitza per espectrofotometria a 560 nm i és proporcional a la urea present en la mostra, d'acord amb les instruccions del fabricant.

3.1.8 Nivells d'anticossos anti-dsDNA

Els nivells d'anticossos anti-dsDNA (IgG + IgA + IgM) es van mesurar utilitzant un *kit* comercial d'ELISA (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) d'acord amb les instruccions del fabricant. Aquest *kit* es basa en la unió d'IgGs, IgAs i IgMs anti-dsDNA de ratolí, presents en les mostres de sèrum, a dsDNA immobilitzat en la placa, detectats posteriorment amb un anticòs anti- IgG+IgA+IgM de ratolí conjugat amb l'enzim HRP per a la reacció enzimàtica. L'absorbància es va llegir a 450 nm i 560 nm. Els valors obtinguts són proporcionals a la quantitat d'IgG anti-dsDNA presents en la mostra.

3.1.9 Histopatologia renal

El talls coronals de ronyó (1-2 mm de gruix) es van fixar en paraformaldehid al 4% i es van incloure en parafina. Per a microscòpia de camp clar, es van utilitzar seccions de 5 µm de gruix que van ser desparafinades en xilè i rehidratades en etanol, i es van tenyir amb hematoxilina (Panreac, Barcelona, Espanya) i eosina (Casa Álvarez, Madrid, Espanya). Després es van deshidratar i es van analitzar amb el microscopi Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments, Amstelyeen, Països Baixos).

Per determinar el grau de dany renal, totes les seccions van ser analitzades per dos patòlegs a cegues. Les lesions actives glomerulars típiques de la NL van ser avaluades: expansió mesangial, proliferació endocapil·lar, dipòsits glomerulars, proliferació extracapil·lar i infiltrats intersticials, així com les lesions cròniques túbul-intersticials:

atrofia tubular i fibrosi intersticial. Aquestes lesions es van avaluar semi-quantitativament utilitzant un sistema de quatre punts: (-) absent, (+) lleu, (++) moderat, (+++) sever. Posteriorment, es va calcular l'àrea de les seccions glomerulars (μm^2) a partir de la mitjana de 150 glomèruls en cada grup de tractament, en imatges digitals obtingudes a $\times 100$ de 3 ratolins per grup, mesurades amb el software ImageJ v1.52c (<http://fiji.sc>; NIH, Bethesda, MD).

3.1.10 Determinació immunofluorescent d'ICs i del sistema de complement dipositats sobre els ronyons

Els talls de ronyó fixats en paraformaldehid al 4% i inclosos en OCT (Sakura) es van guardar a -80°C . Posteriorment, amb el criòstat, es van obtenir seccions de $5\ \mu\text{m}$. Per a l'anàlisi de l'acumulació d'IgG i C3 es va realitzar tinció fluorescent de les crioseccions dels ronyons. Les seccions es van tenyir directament amb anticossos de cabra anti-IgG de ratolí conjugat amb FITC (Sigma-Aldrich) i anti-C3 conjugat amb FITC (Nordic Immunology, Tilburg, Països Baixos) i van ser visualitzades per microscòpia confocal per quantificar la intensitat mitjana de fluorescència (MFI). Al menys es van visualitzar i fotografiar 10 glomèruls per secció amb el microscopi confocal d'immunofluorescència Leica TCS-SL *spectral* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanya).

3.1.11 Assaig de l'activitat del complement

L'activitat de la via clàssica del complement en sèrum fresc es va avaluar mitjançant l'acumulació i dipòsit de C3b sobre cèl·lules K562 (ATCC, LGC Standards, Barcelona, Espanya) opsonitzades amb anticossos policlonals de conill (Agrisera, Vännäs, Suècia). Les cèl·lules K562 van ser cultivades en suspensió en medi DMEM suplementat amb 100 mg/ml d'estreptomicina, 100 IU/ml de penicil·lina, L-glutamina a 2 mM i un 10% (v/v) de FBSi (tots de ThermoFisher). Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS fred i 10^6 cèl·lules es van afegir als tubs de reacció que contenien PBS amb MgCl_2 a 2 mM, CaCl_2 a 0.15 mM, 5 mg/ml d'anticossos per opsonitzar les cèl·lules i un 10% (v/v) de sèrum murí en un volum total de 100 μl . Després de 30 minuts d'incubació a 37°C , les cèl·lules es van rentar amb tampó FACS fred. La

quantitat de C3b dipositada es va quantificar utilitzant un anticòs IgG de cabra anti-C3 de ratolí conjugat amb FITC (MP Biomedicals, Solon, OH) diluït 1:100, que va ser incubat durant 1 hora a 4°C. Les cèl·lules es van rentar tres vegades, es van resuspendre en tampó FACS fred i es van analitzar per citometria de flux amb el citòmetre FACSCanto II (Becton Dickinson). Com a control negatiu es van fer servir mostres de sèrum inactivades a 56°C durant 30 minuts.

3.1.12 Immunohistoquímica

Les seccions processades en parafina de 5 µm de gruix es van desparafinar en xilè i van ser rehidratades en solucions d'etanol a concentracions graduals, rentades amb aigua destil·lada i tractades amb metanol amb un 3% (v/v) de peròxid d'hidrogen durant 30 minuts a temperatura ambient, per eliminar l'activitat de la peroxidasa endògena. Posteriorment, van ser incubades durant 30 minuts a temperatura ambient amb una solució de bloqueig (5% (v/v) de sèrum de cabra en PBS amb 0.1% (v/v) de Tween 20 a pH 7.2) i es van incubar tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris: anticòs policlonal de conill anti-CD11c de ratolí (1:200, Biorbyt, BioNova, Cambridge, Regne Unit), anticòs policlonal de conill anti-Lat de ratolí (1:50, ThermoFisher), anticòs monoclonal de rata anti-Gr1 de ratolí (1:50, R&D Systems, Minneapolis, MN), anticòs monoclonal de rata anti-F4/80 de ratolí (1:50, ThermoFisher) i anticòs monoclonal de rata anti-CD19 de ratolí (1:200, ThermoFisher). Per la detecció del marcador F4/80 es va utilitzar proteïnasa K per fer desenmascarament d'antigen. Després dels rentats amb PBS, les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent: en el cas dels marcadors CD11c i Lat es va utilitzar l'anticòs anti-IgG de conill produït en cabra biotini·lat (1:200, BA-1000, Vector laboratories, Peterborough, Regne Unit) durant 1 hora a temperatura ambient i el *kit* Vectastain (ABC) complex avidina-biotina peroxidasa (Vector laboratories) durant 30 minuts; mentre que per als marcadors Gr1, F4/80 i CD19 es va utilitzar el *kit* ImmPRESS™ HRP anti-IgG de rata (*mouse adsorbed*) produït en cabra (Vector laboratories) durant 1 hora a temperatura ambient (**Taula 11**). La reacció de color es va dur a terme utilitzant 3,3'-diaminobenzidina (DAB) i les seccions es van contratenyir amb hematoxilina (Panreac). Després es van deshidratar

i es va procedir al muntatge. En els controls negatius, utilitzats per comprovar les unions no específiques, l'anticòs primari es va reemplaçar per PBS.

Marcadors	Anticòs primari	Anticòs secundari
CD11c	Anticòs policlonal de conill anti-CD11c de ratolí	Anticòs anti-IgG de conill produït en cabra biotinil-lat + Vectastain (ABC)
Lat	Anticòs policlonal de conill anti-Lat de ratolí	Anticòs anti-IgG de conill produït en cabra biotinil-lat + Vectastain (ABC)
Gr1	Anticòs monoclonal de rata anti-Gr1 de ratolí	ImmPRESS™ HRP anti-IgG de rata (<i>mouse adsorbed</i>) polymer detection kit
F4/80	Anticòs monoclonal de rata anti-F4/80 de ratolí	ImmPRESS™ HRP anti-IgG de rata (<i>mouse adsorbed</i>) polymer detection kit
CD19	Anticòs monoclonal de rata anti-CD19 de ratolí	ImmPRESS™ HRP anti-IgG de rata (<i>mouse adsorbed</i>) polymer detection kit

Taula 11. Anticossos utilitzats en immunohistoquímica del parènquima renal en el model de LES NZBW F1

3.1.13 Assaig TUNEL

La detecció de cèl·lules apoptòtiques es va realitzar mitjançant la tècnica *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling* (TUNEL) utilitzant el kit *TACS TdT in situ DAB* (R&D Systems) segons les instruccions del fabricant. Les seccions renals de 5 µm de gruix es van desparafinar i es van pre-tractar amb proteïnasa K durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de ser rentades en aigua desionitzada, la peroxidasa endògena es va inactivar utilitzant metanol amb un 3% (v/v) de peròxid d'hidrogen durant 5 minuts, seguit d'una incubació amb l'enzim *TdT* a 37°C durant 1 hora. Després les seccions es van submergir en tampó *Tdt Stop* i van ser incubades amb una solució d'estreptavidina amb HRP a 37°C durant 10 minuts seguit d'una solució de DAB. Els talls es van contratenyir amb una solució a l'1% de verd de metil. Les cèl·lules positives per a l'assaig TUNEL es van observar per microscòpia òptica. El número de cèl·lules apoptòtiques corticals es va quantificar en 10 camps de les seccions renals de tres mostres per grup i estan donades en cèl·lules apoptòtiques/camp. També es van quantificar les cèl·lules apoptòtiques intraglomerulars quantificant el número de cèl·lules en 10 glomèruls per secció (30 glomèruls/grup) i es van expressar com a cèl·lules apoptòtiques per secció glomerular (cèl·lules/*glomerular cut section(gcs)*). Per a l'anàlisi de les imatges digitals a x200 i x400 augments respectivament, es va fer servir el software ImageJ v1.52c (NIH).

3.1.14 Anàlisi de l'expressió gènica diferencial

L'RNA total dels ronyons de ratolí es va extreure utilitzant el *kit RNeasy Mini* (Qiagen). La transcripció reversa es va realitzar utilitzant el *kit High-capacity cDNA archive* (Applied Biosystems, ThermoFisher, Carlsbad, CA). El perfil d'expressió gènica es va realitzar amb plaques de microfluídica *Custom TaqMan Low Density Array Cards* (Applied Biosystems) de 384 pous precarregats amb 377 *assays* d'expressió gènica per a transcrits rellevants en la NL murina (309–311). Quatre pous de cada placa incloïen l'*assay* d'expressió gènica 18S com a control intern. Així, amb el cDNA resultant de la transcripció reversa es van formar *pools* de 2-3 ratolins per grup de tractament per a cada placa (2-3 ratolins/*pool*; 3 plaques/grup) i van ser analitzats per reacció en cadena de la polimerasa quantitativa amb transcriptasa reversa (RT-qPCR) amb el sistema 7900HT Real-Time PCR (Applied Biosystems) i el perfil tèrmic especificat a la **taula 12**. Les dades es van obtenir amb SDS v2.4 i RQ Manager v1.2.1 i van ser analitzades amb el *software* DataAssist v3.0 (tots d'Applied Biosystems) i normalitzades utilitzant 3 controls endògens (*Actb*, *Gapdh* i *Gusb*). Els valors obtinguts es van relativitzar utilitzant el grup control tractat amb PBS com a referència.

Etapa	Pas	Temperatura	Temps
<i>Hold</i>	Incubació UNG	50°C	2 minuts
<i>Hold</i>	Activació de la polimerasa	94.5°C	10 minuts
Cicles (40)	Desnaturalització	97°C	30 segons
	Unió <i>assay</i> i amplificació	59.7°C	1 minut

Taula 12. Perfil tèrmic de la RT-qPCR amb *Custom TaqMan Low Density Array Cards* utilitzada en el model murí de LES NZBW F1

Configuració del perfil tèrmic de la RT-qPCR amb *Custom TaqMan Low Density Array Cards* (Applied Biosystems) per als *pools* de cDNA procedent de l'RNA total extret dels ronyons. UNG: uracil-N glicosilasa.

Els gens que van resultar diferencialment expressats entre les mostres es van analitzar utilitzant el *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems, Qiagen) per identificar les xarxes biològiques i moleculars regulades de forma diferencial en aquest model. El *software* IPA és un recurs per a l'anàlisi de les vies d'interacció gènica que inclou les vies canòniques i també bases de dades de coneixement basades en l'experiència científica. Així, els gens que s'expressaven de forma diferencial en, almenys 1.8 vegades, sobre-expressats o inhibits, es van importar i es van analitzar en

Metodologia

la base de dades de l'IPA. D'aquesta manera, en funció de la connectivitat directa o indirecta dels gens, segons es descriu en la literatura, aquests es van mapejar en vies biològiques i xarxes de malalties. Com a punt de tall per aquestes funcions biològiques, xarxes i vies de senyalització significatives es va considerar un p-valor < 0.05 (test de Fisher). La significació estadística donada com *overlap p-value* mesura si hi ha un solapament (*overlap*) estadísticament significatiu entre el nostre conjunt de dades i de la "Ingenuity® Knowledge Base". La direccionalitat del procés o de la via regulada diferencialment de forma significativa, es va predir quan $2 < z\text{-score} < -2$. El valor *z-score* calculat en el *software* IPA és un valor d'activació de les funcions biològiques o les malalties a les que fa referència, de manera que si s'obté un valor positiu indica un increment de l'activació d'aquesta biofunció o malaltia, mentre que un *z-score* negatiu indica una disminució.

Els transcrits gènics seleccionats es van validar en mostres de ronyó de ratolins de forma individual utilitzant RT-qPCR en el sistema QuantStudio™ 5 System (Applied Biosystems) amb els *assays TaqMan Gene Expression* (Applied Biosystems): *IL-12a*, *Irf7*, *Lat*, *Cd19*, *Ms4a1*, *Tnfrsf13c*, *Prtn3*, *S100a8*, *S100a9*, *Serpina6*, *Serpina1a*, *Robo1*, *Saa1*, *Adh1*, *Adh7*, *Chga* i *Pnmt* amb el perfil tèrmic d'amplificació que s'especifica a la **taula 13**. La quantificació es va realitzar amb el mètode $\Delta\Delta C_t$, utilitzant *Gusb* com a transcrit endògen de referència. El *fold change* (FC) relatiu de l'abundància de mRNA es va calcular amb l'equació $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Etapa	Pas	Temperatura	Temps
Hold	Incubació UNG	50°C	2 minuts
Hold	Activació de la polimerasa	95°C	10 minuts
Cicles (40)	Desnaturalització	95°C	15 segons
	Unió <i>assay</i> i amplificació	60°C	1 minut

Taula 13. Perfil tèrmic de la RT-qPCR per a la validació utilitzada en el model murí de LES NZBW F1

Configuració del perfil tèrmic de la RT-qPCR amb els *assays TaqMan Gene Expression* (Applied Biosystems) per a les mostres de cDNA procedent de l'RNA total renal del ratolins. UNG: uracil-N glicosilasa.

Les vies cel·lulars relacionades amb els gens validats per RT-qPCR que resultaven regulats de forma diferencial es van estudiar a través de PathwAX, que utilitza la xarxa FunCoup per analitzar les vies de comunicació entre una llista de gens consultats i les vies de l'Enciclopèdia de Gens i Genomes de Kyoto (KEGG).

3.1.15 Array de citocines

L'anàlisi de citocines es va realitzar en els sèrums obtinguts del dia del sacrifici; i en teixit renal, a partir de la proteïna total que es va extreure dels ronyons. Aquests lisats tissulars es van obtenir per homogeneïtzació de les mostres de ronyó, desfetes amb un morter submergit en neu carbònica i dissolent amb PBS suplementat amb inhibidors de proteases: aprotinin (Sigma-Aldrich), leupeptin i pepstatin A (els dos de Tocris Bioscience, Bristol, Regne Unit) (tots a 10 µg/ml) utilitzant l'homogeneïtzador Dounce (Knotes Glass, Vineland, NJ) en fred. Es va afegir Tritó X-100 a una concentració final d'un 1% (v/v) i es va fer un cicle de congelació en neu carbònica i descongelació a 37°C. Finalment es va centrifugar a 10 000 g durant 5 minuts i el sobrenedant obtingut es va congelar a -80°C. La concentració de proteïna total obtinguda es va quantificar per assaig BCA amb el kit *PierceTM BCA Protein Assay* (ThermoFisher).

Per a l'anàlisi de citocines presents en sèrum i lisats es van fer *pools* de 2 ratolins per grup (100 ml per a les mostres de sèrum i 300 µg d'extractes proteics). En aquestes mostres, es van determinar els nivells relatius de 40 citocines, quimiocines i proteïnes de fase aguda murines utilitzant el kit *Proteome Profiler Array "Mouse Cytokine Array Panel A"* (R&D systems), segons les instruccions del fabricant. Aquesta tècnica es basa en un immunoassaig de tipus *sandwich* format per membranes de nitrocel·lulosa que contenen 40 anticossos pre-incubats per duplicat dirigits contra proteïnes específiques (**Taula 14**). Així, un cop incubades les mostres, prèviament biotinitades, es va afegir estreptavidina conjugada amb HRP i les membranes es van revelar per quimioluminescència incubant-les durant 1 minut amb ECL (Pierce, ThermoFisher) en la foscor. Finalment les membranes es van exposar i es van llegir en el sistema iBright CL1000 (ThermoFisher).

CXCL13/BLC/BCA-1	IL-1ra/IL-1F3	IL-16	CXCL9/MIG
C5a	IL-2	IL-17	CCL3/MIP-1 α
G-CSF	IL-3	IL-23	CCL4/MIP-1 β
GM-CSF	IL-4	IL-27	CXCL2/MIP-2
CCL1/I-309	IL-5	CXCL10/IP-10	CCL5/RANTES
CCL11/Eotaxin	IL-6	CXCL11/I-TAC	CXCL12/SDF-1
ICAM-1	IL-7	CXCL1/KC	CCL17/TARC
IFN- γ	IL-10	M-CSF	TIMP-1
IL-1 α /IL-1F1	IL-12p70	CCL2/MCP-1	TNF- α
IL-1 β /IL-1F2	IL-13	CCL12/MCP-5	TREM-1

Taula 14. Citocines, quimiocines i proteïnes de fase aguda analitzades pel *Mouse Cytokine Array Panel A*

El nom complet es troba indicat al llistat d'abreviatures.

3.1.16 ELISA: quantificació de la quimiocina CXCL13 (BLC)

Els nivells de quimiocina CXCL13 presents en sèrum i en els lisats tissulars es van quantificar en mostres de ratolins de forma individualitzada utilitzant el *kit* d'ELISA *LEGEND MAX Mouse CXCL13 (BLC)* (BioLegend, San Diego, CA) segons les instruccions del fabricant.

El kit consisteix en una placa que porta pre-incubat un anticòs monoclonal de rata anti-CXCL13 murina i un segon anticòs monoclonal de rata anti-CXCL13 murina biotinitat que s'incuba després de les mostres per a la seva detecció mitjançant avidina conjugada amb HRP i el seu substrat. L'absorbància es va mesurar immediatament, després d'aturar la reacció, a 450 nm i 560 nm en el lector de plaques Victor X5 (PerkinElmer).

3.1.17 Anàlisi estadístic

Els anàlisis estadístics i la visualització gràfica de les dades es van realitzar utilitzant el programa GraphPad Prism 6.0 (Graphpad software, Inc, La Jolla, CA). Per analitzar els valors de proteïnúria, albuminúria, BUN, anticossos anti-dsDNA, activitat del complement i la quantificació del nivell de dermatitis en els diferents estudis es va utilitzar l'anàlisi bidireccional de la variància amb el mètode Holm-Šidák per a comparacions múltiples. Per valorar les dades histològiques i els nivells de quimiocina CXCL13 es va utilitzar el test estadístic d'anàlisi de la variància unidireccional amb la correcció per a comparacions múltiples de Dunnett. Per avaluar les diferències en la

supervivència es van realitzar corbes de Kaplan-Meier juntament amb el test log-rank (Mantel-Cox). Els ratolins tractats amb PBS es van utilitzar com a grup de referència, excepte en els casos indicats. En l'etapa de validació dels nivells d'expressió gènica diferencials entre els grups de tractament amb C4BP(β -) i CYP, aquests es van relativitzar amb les dades del grup control i es van analitzar amb test t d'una mostra. Aquestes dades s'expressen com a mitjana \pm desviació estàndard (SD). Per comparar les dades de citometria de flux (MFI) es va utilitzar el test de Friedman amb la correcció *post-hoc* de Dunn's. Aquestes dades s'expressen com a mediana \pm rang interquartilic (IQR). En tots els casos es va considerar significatiu un p-valor < 0.05 .

3.2 Model murí de CU induïda per DSS

3.2.1 Proteïnes i fàrmacs

En aquest estudi, la proteïna plasmàtica C4BP(β -) humana es va fer servir com a tractament experimental. Es van administrar 50 μ g de C4BP(β -), diluïda en PBS a una concentració de 0.33 mg/ml, a cada ratolí. La minociclina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), utilitzada com a tractament de referència, es va dissoldre en carboximetilcelulosa (al 0.5% (p/v) en aigua) amb un 0.1% (v/v) de Tween-80 fins a una concentració de 5 mg/ml i es va administrar una concentració de 50 mg per kg de pes dels ratolins. Aquestes preparacions es van realitzar immediatament abans de la seva administració.

3.2.2 Disseny experimental

Aquest primer estudi es va realitzar en col·laboració amb l'empresa Draconis Pharma, SL. (Barcelona, Espanya).

El model de CU es va establir per addició de DSS (35-50kDa; TdB Consultancy, Uppsala, Suècia) en l'aigua per beure a una concentració del 2% (p/v), filtrada a través d'un filtre d'acetat de cel·lulosa de 0.22 μ m i va ser administrada als ratolins *ad libitum*. A dia 3, les solucions amb DSS van ser substituïdes per una nova solució al 2% (p/v) de DSS. A dia 5, les solucions van ser reemplaçades per aigua normal fins a dia 9. Els animals del grup blanc (sense inducció de CU) van rebre aigua durant tot l'estudi.

Metodologia

En aquest estudi preliminar es van fer servir 38 ratolins C57BL/6 mascles amb 7 setmanes d'edat (aproximadament 22 g) proporcionats per Envigo (Barcelona, Espanya).

Els animals dels grups blanc (sense malaltia, n=8) i DSS (CU induïda amb DSS, n=12) van ser injectats a dia 0 amb una dosi única de PBS (0.15 ml) com a vehicle de tractament. C4BP(β -) (n=8) va ser administrada per via subcutània (0.15 ml) a 50 μ g/ratolí els dies 4, 6 i 8. La minociclina (n=10) va ser administrada diàriament (dia 0 fins a dia 8) per via oral a 50 mg/Kg o 10 ml/Kg (Figura 25 i Taula 15).

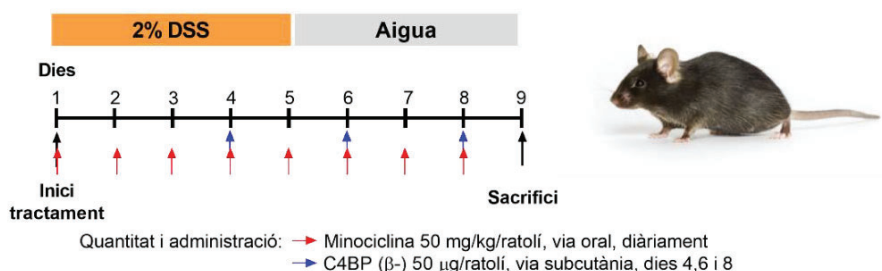


Figura 25. Pauta de tractament en el model animal de CU induïda per DSS per a l'avaluació del potencial de C4BP(β -)

Esquema de la pauta d'administració per la injecció subcutània de C4BP(β -) (fletxes blaves) i l'administració oral de minociclina (fletxes vermelles) en el model murí de CU induïda per dextrà sulfat sòdic (DSS) en C57BL/6.

Grup	Inducció de CU (d0-d5)	Tractament	Dies	Dosi (μ g)	Volum (ml)	Via	N
Blanc	No – Aigua		0	0	0.15	SC	8
DSS	DSS 2%		0	0	0.15	SC	12
C4BP(β -)	DSS 2%	C4BP(β -)	4, 6 i 8	50	0.15	SC	8
Tractament de referència	DSS 2%	Minociclina	0-8	50	10	PO	10

Taula 15. Grups experimentals i administració del tractament en el model de CU induïda per DSS

SC, via subcutània; PO, via oral.

Els animals es van mantenir sota condicions estàndard de laboratori, en un ambient controlat a 20-24°C i un 40-70% d'humitat relativa amb cicles de llum/fosc de 12 hores. Es van alimentar amb una dieta estàndard de manteniment i aigua *ad libitum*.

El pes corporal dels animals, la presència de sang en els excrements i la consistència d'aquests, van ser avaluats diàriament per a cada ratolí. Aquests paràmetres es van quantificar assignant una puntuació d'acord amb els criteris establerts a la **taula 16** en el pla d'estudi, utilitzada posteriorment per calcular diàriament un índex de l'activitat de la malaltia (DAI) per cada animal.

Puntuació	Pèrdua de pes corporal	Consistència dels excrements	Sang visible en femta o sagnat al recte
0	no hi ha	normal	absència
0.5	1-5%		
1	5-10%		
2	10-20%	excrements semi-líquids	
3	20-25%		
4	>25%	diarrea	presència

DAI (0-4) = \sum puntuació de cada paràmetre / n paràmetres avaluats

Taula 16. Càlcul del DAI en el model murf de CU induïda per DSS

Basat en (312).

A dia 9, 5 animals de cada grup van ser anestesiats amb isoflurà i es van recollir mostres de sang de la vena cava en tubs Microtainer® (Becton Dickinson) i es van deixar 30 minuts a temperatura ambient. Els tubs es van centrifugar a 11 000 g durant 2 minuts i els sèrums obtinguts es van congelar a -80°C.

Posteriorment, tots els animals van ser eutanasiats per inhalació de CO₂. A tots els ratolins se'ls va extreure l'intestí, que es va netejar de greix i de restes de mesenter. El colon de cada ratolí es va pesar i es va mesurar la seva llargada. A continuació, cada colon es va obrir longitudinalment i es va avaluar macroscòpicament amb una puntuació segons el dany visible per un observador, d'acord amb els criteris especificats a la **taula 17**.

Puntuació	Consistència dels excrements	Sang visible	Inflamació
0	sòlid	absència	normal
1	excrements semi-líquids	excrements vermells	inflamació lleu
2	excrements líquids	excrements amb sang, obscur/vermellosos	inflamació moderada i/o edema
3	absència, diarrea líquida o amb moc	sang al llarg de tot el colon	inflamació severa i/o úlceres i/o edema

Puntuació final (0-9) = \sum puntuació de cada paràmetre

Taula 17. Puntuació macroscòpica en el model murf de CU induïda amb DSS

Basat en (313).

Posteriorment, es van realitzar dues seccions consecutives en el colon (d'uns 0.5 cm) des de la part distal i es van guardar en 1 ml de paraformadehid al 4%. Aquestes mostres es van guardar a 4°C per ser processades en blocs de parafina i per fer inclusió en OCT (Sakura). La resta del colon es va seccionar en dos fragments longitudinals, una part es va congelar directament en N₂ líquid i va ser guardada a -80°C i l'altra part es va guardar en 1 ml de *RNA later* (Qiagen) i va ser congelada a -80°C.

Els animals es van mantenir d'acord amb les directrius europees per a la protecció dels animals vertebrats utilitzats en experimentació i altres objectius científics (86/609/EU) Decret 214/1997. Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació en Animals i Humans (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (procediment n° 3101) i de la Comissió d'Experimentació amb Animals de la Generalitat de Catalunya (DAAM: 8834).

3.2.3 Histopatologia en colon distal

El talls longitudinals de colon es van fixar en paraformaldehid al 4% i es van incloure en parafina. Per a microscòpia de camp clar, es van utilitzar seccions de 5 µm de gruix que van ser tenyides amb hematoxilina (Panreac) i eosina (Casa Álvarez) i es van analitzar amb el microscopi Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments).

3.2.4 SDS-PAGE i anàlisi per Western Blot

Per obtenir els lisats tissulars es van utilitzar les mostres de colon, que s'havien congelat directament en N₂ líquid i posteriorment a -80°C, seguint els procediments especificats prèviament per a l'obtenció de proteïna total en l'apartat 3.1.15.

Les mostres de proteïna total obtinguda en els lisats de teixit intestinal es va analitzar per SDS-PAGE en gels Bis-Tris amb gradient 4-12% (ThermoFisher) sota condicions reductores (30 ng/carril). Després de la transferència, la membrana es va bloquejar durant tota la nit a 4°C en tampó TBS (Tris a 10mM i NaCl a 50 mM) amb un 0.05% (v/v) de Tween 20 (TBST) i un 3% (p/v) de llet desnatada en pols. Al dia següent la membrana es va incubar amb els anticossos següents: anticòs monoclonal de ratolí anti-claudina-1 (A-9), anticòs monoclonal de ratolí anti-occludina (E-5), anticòs monoclonal de rata anti-ZO-1 (R40.76); tots conjugats amb HRP (tots de Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) a una dilució 1:500 en TBST i un 1% (p/v) de llet durant 1 hora a temperatura ambient. La detecció de totes les membranes es va realitzar per quimioluminiscència incubant les membranes durant 1 minut amb ECL (Pierce) en la foscor i utilitzant ChemiDoc Imager (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.2.5 ELISA: quantificació del nivell d'endotoxines en sèrum

La concentració d'endotoxines en les mostres de sèrum dels ratolins es va quantificar de forma individualitzada amb el *kit* d'ELISA *Mouse Endotoxin* (MyBiosource, San Diego, CA) segons les instruccions del fabricant. La placa proporcionada pel *kit* porta pre-incubat un anticòs monoclonal anti-endotoxina de ratolí, i l'anticòs de detecció, que es va incubar després de les mostres, és un anticòs policlonal marcat amb biotina. Posteriorment, el conjugat avidina-HRP s'afegeix als pous i s'utilitza TMB com a substrat per a la reacció enzimàtica colorimètrica que es llegeix, després d'aturar la reacció, a 450 nm i 560 nm en el lector de plaques Victor X5 (PerkinElmer).

3.2.6 Anàlisi de l'expressió gènica diferencial

L'RNA total procedent de les mostres de colon dels ratolins es va extreure utilitzant el *kit Maxwell® RSC simplyRNA Tissue* (Promega, Madison, WI) de les mostres

inicialment guardades en *RNA later* (Qiagen). La transcripció reversa es va realitzar utilitzant el *kit High-capacity cDNA archive* (Applied BioSystems). Els transcrits gènics *IL-12a*, *Irf7*, *Lat*, *Cd19*, *Ms4a1*, *Tnfrsf13c*, *Prtn3*, *S100a8*, *S100a9*, *Robo1*, *Saa1*, *Chga*, *Stat1*, *MyD88*, *Adrb2*, *Pparγ*, *Rnf5*, *Haptoglobin* i *Adh1* es van analitzar en mostres de colon individuals per RT-qPCR utilitzant *assays TaqMan Gene Expression* (Applied Biosystems) segons el perfil tèrmic especificat a la **taula 13** en l'apartat **3.1.14**. La quantificació es va realitzar amb el mètode $\Delta\Delta C_t$ utilitzant *Gusb* com a transcrit endogen de referència. El FC relatiu es va calcular amb l'equació $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalitzant per al grup blanc sense malaltia.

3.2.7 ELISA: quantificació de S100a8/S100a9 (calprotectina)

La concentració de S100a8/S100a9 en proteïna total procedent de les mostres de colon es va quantificar fent servir el *kit Mouse S100a8/S100a9 Heterodimer DuoSet Elisa* (R&D Systems) segons les instruccions del fabricant. Així, es va pre-incubar la placa amb un anticòs de rata anti-S100a8/S100a9 de ratolí i un cop afegides les mostres, es va incubar amb un anticòs biotinitat de cabra anti-S100a8/S100a9 de ratolí. Posteriorment es va afegir estreptavidina conjugada amb HRP i el substrat TMB per a la reacció enzimàtica colorimètrica. L'absorbància es va mesurar a 450 nm i 560 nm en el lector de plaques Victor X5 (PerkinElmer).

3.2.8 Array de citocines

Per a l'anàlisi de citocines es van fer servir els sèrums obtinguts del dia del sacrifici fent *pools* de 4 ratolins per grup en un volum total de 100 μ l. Amb l'objectiu de determinar la presència de múltiples citocines, quimiocines i proteïnes de fase aguda presents en les mostres de sèrum dels ratolins del model experimental, es va utilitzar l'*array* de citocines *Proteome Profiler "Mouse Cytokine Array Panel A"* (R&D Systems) (veure **taula 14** i informació tècnica en l'apartat **3.1.15**) segons les instruccions del fabricant.

3.2.9 ELISA: quantificació de la quimiocina CXCL13 (BLC)

Per determinar la concentració de la quimiocina CXCL13 (BLC) en les mostres individuals de sèrum i de lisats tissulars, es va fer servir el *kit* comercial d'ELISA *LEGEND MAX™ Mouse CXCL13 (BLC)* (BioLegend) (veure informació tècnica en l'apartat 3.1.16).

3.2.10 Immunohistoquímica

Per a l'anàlisi immunohistoquímic, les mostres es van incubar tota la nit a 4°C amb els anticossos primaris: anticòs policlonal de conill anti-CD11c de ratolí (1:200, Biorbyt), anticòs policlonal de conill anti-BAFFR de ratolí (1:200, ThermoFisher), anticòs monoclonal de rata anti-F4/80 de ratolí (1:50, ThermoFisher). Per a la detecció del marcador F4/80 es va utilitzar proteïnasa K per fer desenmascarament d'antigen, mentre que per a la detecció de CD11c i BAFFR es va fer servir tampó de citrat (àcid cítric a 10 mM amb 0.05% (v/v) de Tween 20 a pH 6) per al desenmascarament, a 95°C durant 20 minuts. Després dels rentats amb PBS, les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent: en el cas dels marcadors CD11c i BAFFR es va utilitzar l'anticòs anti-IgG de conill produït en cabra biotinil·lat (1:200, Vector laboratories) i la detecció es va fer amb el *kit* Vectastain (ABC) avidina-biotina peroxidasa (Vector laboratories), i en el cas del marcador F4/80 es va fer servir el *kit* ImmPRESS™ HRP anti-IgG de rata (*mouse adsorbed*) produït en cabra (Vector laboratories).

3.2.11 Anàlisi estadístic

Els anàlisis estadístics i la visualització gràfica de les dades es van realitzar utilitzant el programa GraphPad Prism 6.0 (Graphpad software, Inc). Les dades de pes corporal i les dades relatives al DAI es van analitzar utilitzant l'anàlisi bidireccional de la variància amb la correcció *post-hoc* de Holm-Šidák per a comparacions múltiples. L'àrea sota la corba (AUC), la puntuació macroscòpica del colon, els paràmetres relatius a les mostres de colon i les dades relatives als nivells d'endotoxina i de citocines es van analitzar amb l'anàlisi de la variància unidireccional amb correcció per a comparacions

múltiples de Dunnett. El percentatge d'inhibició del DAI relatiu al grup control es va calcular com a:

$$\% \text{inhibició} = 100 - (B/A \times 100)$$

A = mitjana del grup control – mitjana del grup blanc

B = dades individuals (grups de tractament) – mitjana del grup blanc

Els nivells d'expressió gènica diferencials entre els grups de tractament es van relativitzar amb les dades del grup blanc i es van comparar amb el grup DSS mitjançant test t d'una mostra. En tots els anàlisis estadístics es va utilitzar el grup DSS com a referència. Les dades es van representar i es van expressar com a mitjana \pm SD. En tots els casos, un p-valor < 0.05 es va considerar significatiu.

3.3 Caracterització de la variant immunomoduladora PRP6-HO7

3.3.1 Obtenció i purificació de C4BP(β +) nua, PRP5/8-HO7, PRP6-HO7 i PRP6-NO

En els assajos *in vitro* per la caracterització de l'activitat immunomoduladora de la proteïna PRP6-HO7, addicionalment a les proteïnes prèviament utilitzades en els models animals (veure secció 3.1.1) es van fer servir les proteïnes que s'especifiquen a continuació i que es troben representades en la **figura 26**:

- Isoforma de C4BP plasmàtica amb cadena β nua (C4BP(β +) nua): correspon a la isoforma majoritària $\alpha 7\beta 1$ purificada de plasma humà sense portar unida PS.

Aquesta forma alternativa de C4BP(β +) desproveïda de PS anticoagulant va ser obtinguda dialitzant C4BP(β +)–PS (anomenada també simplement C4BP(β +) front Tris-HCl a 10 mM i pH 7.5 amb un 80% (v/v) d'etilenglicol, i purificada per cromatografia amb heparina-sefarosa.

A més de les formes completes de la proteïna C4BP que s'han especificat fins ara, es van obtenir tres variants recombinants per enginyeria genètica:

- PRP5/8-HO7 (*Proline-rich Protein domains CCP5-CCP8 heptamerized*): és un homo-oligòmer de 295.4 kDa format per set polipèptids recombinants (42.2 kDa

cadascun) i conté des del domini CCP5 fins el domini CCP8 i el domini d'oligomerització de la cadena α de C4BP. Així, PRP5/8-HO7 no presenta els dominis CCP1-CCP4, pel que s'elimina l'activitat inhibidora del complement i d'unió a diferents patògens.

- PRP6-HO7 (*Proline-rich Protein domain CCP6 heptamerized*): és un homo-oligòmer de 100 kDa format per set polipèptids recombinants (14.3 kDa cadascun) dissenyat per unió del domini N-terminal CCP6 amb un *tag* de sis histidines i el domini d'oligomerització de la cadena α de C4BP, per tant, conté només el domini amb activitat anti-inflamatòria i immunomoduladora (94,98).

Seqüència del monòmer de PRP6-HO7:

HHHHHHLCCPEPKLNNGEITQHRKSRPANHCVYFYGDEISFSCHETSRFSAICQGDGT
WSPRTPSCGSDETPEGCEQVLTGKRLMQCLPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQRDS
ARQSTLDKEL

La predicció estructural de l'homo-oligòmer PRP6-HO7 es va realitzar per modelatge comparatiu d'estructura de proteïnes amb MODELLER v10.1 (314) fent servir les estructures cristal·logràfiques adequades en forma de plantilles múltiples. D'aquesta manera, l'estructura dels dominis CCP1 i CCP2 de la cadena α de C4BP (PDB 5I0Q) van ser utilitzades com a plantilles pel domini CCP6 N-terminal de PRP6-HO7 (315) i l'estructura heptamèrica del complex central C-terminal de C4BP es va agafar de PDB 4B0F (316). Es van introduir les restriccions adequades per garantir el reconeixement dels dos enllaços disulfur presents en CCP6 (Cys365-Cys409 i Cys399-Cys422), i es va establir l'organització heptamèrica del motiu helicoidal C-terminal mitjançant restriccions de simetria. Així, es van calcular mil models per a la seqüència objectiu i el model amb el valor més baix de puntuació en la valoració DOPE es va seleccionar com a millor model (317). La qualitat estereoquímica del model seleccionat va ser avaluada amb MolProbity (318).

- PRP6-NO (*Proline-rich Protein domain CCP6 not oligomerized*): aquesta proteïna de 12.7 kDa està formada per unió del domini N-terminal CCP6 amb un *tag* de sis histidines i una versió mutada del domini d'oligomerització de C4BP que la incapacita per oligomeritzar, degut al reemplaçament de dos residus de cisteïna

per alanines i la deleció dels últims 13 aminoàcids C-terminals (98) com es pot observar en la seva seqüència:

Seqüència del monòmer PRP6-NO: Δ 537-549/C498A/C510A

HHHHHHLCCPEPKLNNGEITQHRKSRPANHCVFYFGDEISFSCHETSRSFSAICQGDGT
WSPRTPCGSD~~ETPEGA~~EQVLTGKRLMQALPNPEDVKMALEVYKLSLEIEQLELQ

El *tag* de sis histidines a l'extrem N-terminal d'aquestes variants té com a objectiu millorar la seva purificació i detecció.

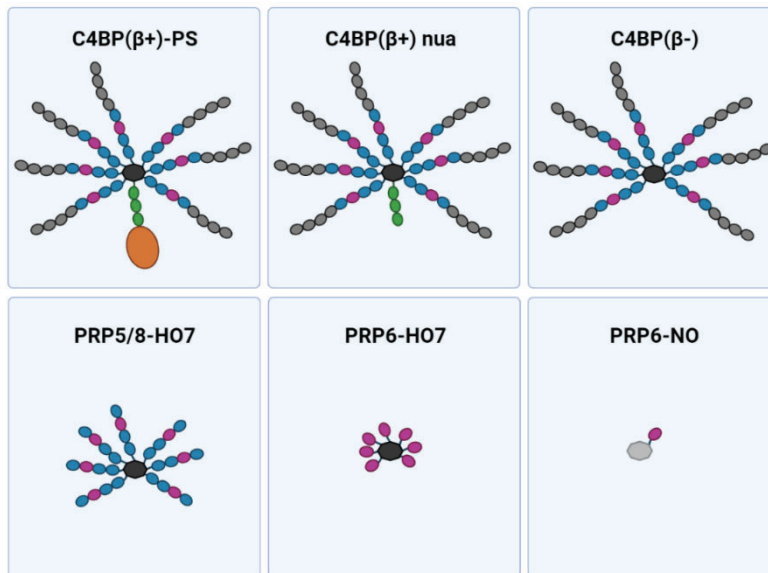


Figura 26. Representació estructural de les proteïnes utilitzades en l'estudi per a la caracterització de la variant immunomoduladora PRP6-HO7

Les variants PRP5/8-HO7, PRP6-HO7 i PRP6-NO van ser clonades en el vector d'expressió pcDNA3.1(+) (ThermoFisher). El DNA plasmídic es va amplificar i es va purificar utilitzant el *kit Qiafilter Plasmid MegaKit* (Qiagen). Les cèl·lules HEK293 (Expi293) (ThermoFisher) es van créixer en suspensió fins que es va assolir el volum de cultiu cel·lular desitjat amb 2.5×10^6 cèl·lules/ml i un 98% de viabilitat. Les cèl·lules es van transfectar amb 1 mg de DNA per litre de cultiu i després es van incubar durant 7 dies a 37°C, amb agitació a 125 rpm i un 8% de CO₂. Finalment, es va recollir el medi de cultiu i es va centrifugar durant 30 minuts a 6000 g i 4°C. El sobrenedant es va utilitzar per purificar la proteïna. La purificació de la variant PRP5/8-HO7 es va

realitzar en quatre etapes seqüencials: cromatografia amb heparina, cromatografia d'interacció hidrofòbica (butil), cromatografia d'intercanvi aniònic (sefarosa Q) i finalment per cromatografia per exclusió de mida (Superdex). PRP6-HO7 i PRP6-NO es van purificar per cromatografia d'afinitat per níquel (HisTrap FF). Totes les columnes de cromatografia eren de GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Suècia).

Aquestes variants PRP es van concentrar, dialitzar i recuperar en tampó PBS a pH 7.4 amb més d'un 85% de puresa, com es va comprovar per SDS-PAGE en gel de Bis-Tris amb un gradient del 4-12% (ThermoFisher) sota condicions reductores i no reductores i tinció *Blue Safe* (NZYTech).

3.3.2 SDS-PAGE i anàlisi per Western Blot

Les proteïnes C4BP(β^+)-PS i C4BP(β^+) nua es van avaluar per SDS-PAGE en gel de Tris-Acetata amb un gradient del 3-8% (ThermoFisher) sota condicions reductores i no reductores i van ser transferides a una membrana de PVDF activada durant 30 segons en metanol. Posteriorment, es va realitzar el bloqueig en tampó TBST i un 3% (p/v) de BSA durant 2 hores i la membrana es va incubar durant tota la nit a 4°C amb un anticòs policlonal de conill anti-C4BP (PK9008) diluït 1:2 000 en TBST i un 1% (p/v) de BSA. Al dia següent, la membrana es va rentar tres vegades durant 10 minuts amb TBST seguit d'una incubació amb l'anticòs secundari policlonal de cabra anti-IgG de conill amb HRP (P0448, Dako) diluït 1:2 000 durant 1 hora a temperatura ambient. Posteriorment, es van fer dos rentats de 10 minuts amb TBST i dos més amb TBS.

Ambdues proteïnes, C4BP(β^+)-PS i C4BP(β^+) nua també es van córrer en un gel en condicions no reductores per a la incubació amb anticòs monoclonal de ratolí anti-Proteïna S/PROS1 humana (R&D systems) diluït 1:1 000 durant 1 hora a temperatura ambient seguit d'una incubació amb l'anticòs policlonal de cabra anti-IgG de ratolí conjugat amb HRP (P0447, Dako) en una dilució 1:2 000 durant 1 hora a temperatura ambient.

Les variants PRP6-HO7 i PRP6-NO es van sotmetre a electroforesi en gels de Bis-Tris amb gradient 4-12% (ThermoFisher) sota condicions reductores i no reductores.

Metodologia

Després del bloqueig, la membrana es va incubar amb els anticossos primaris tota la nit a 4°C: anticòs policlonal de conill anti-C4BP en dilució 1:2 000, anticòs monoclonal de ratolí anti-6xHis (Takara Bio, Mountain View, CA) en dilució 1:4 000, seguits de l'addició dels anticossos secundaris incubats durant 1 hora, respectivament: anticòs policlonal de cabra anti-IgG de conill amb HRP (P0448, Dako) diluït 1:2 000 i un anticòs policlonal de cabra anti-IgG de ratolí amb HRP (P0447, Dako) diluït 1:2 000. Tots els anticossos utilitzats es resumeixen en la **taula 18**.

La detecció de totes les membranes es va realitzar per quimioluminiscència incubant les membranes durant 1 minut amb ECL (Pierce) en la foscor i utilitzant ChemiDoc Imager (Bio-Rad).

Proteïnes	Condicions	Anticòs primari	Anticòs secundari
C4BP(β +) -PS C4BP(β +) nua PRP6-HO7 PRP6-NO	Reductores No reductores	Anticòs policlonal de conill anti-C4BP (PK9008)	Anticòs policlonal de cabra anti-IgG de conill amb HRP
C4BP(β +) -PS C4BP(β +) nua	No reductores	Anticòs monoclonal de ratolí anti-Proteïna S/PROS1 humana	Anticòs policlonal de cabra anti-IgG de ratolí amb HRP
PRP6-HO7 PRP6-NO	No reductores	Anticòs monoclonal de ratolí anti-6xHis	Anticòs policlonal de cabra anti-IgG de ratolí amb HRP

Taula 18. Anticossos utilitzats en l'avaluació de C4BP(β +) -PS, C4BP(β +) nua, PRP6-HO7 i PRP6-NO

3.3.3 Assaig de l'activitat inhibidora del complement de C4BP com a cofactor en l'escissió de C4b

Les proteïnes del complement C4b (8.9 μ g/ml) i FI (4.4 μ g/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) es van barrejar amb les isoformes de C4BP i amb PRP6-HO7 (a 0.6 nM o 6 nM segons s'especifica) en tampó fosfat a 25 mM a pH 7.4 i NaCl a 25 mM, en un volum total de 60 μ l i van ser incubades a 37°C durant 30 minuts (109). Posteriorment, es va afegir tampó SDS reductor a les mostres i els fragments de C4b es van analitzar mitjançant SDS-PAGE en un gel de Bis-Tris amb gradient del 4-12% (ThermoFisher) i van ser transferits a una membrana de PVDF activada durant 30 segons en metanol. Posteriorment es va realitzar el bloqueig en tampó TBST i un 3% (p/v) de BSA durant 2 hores. Els fragments de C4b es van analitzar per Western Blot utilitzant un anticòs

monoclonal anti-C4d humà (Quidel, San Diego, CA) en una dilució 1:2 000 en TBST i un 1% (p/v) de BSA, incubat durant tota la nit a 4°C. Posteriorment la membrana es va rentar tres vegades durant 10 minuts amb TBST seguit d'una incubació amb l'anticòs secundari policlonal cabra anti-ratolí IgG amb HRP en una dilució 1:2 000 (P0447, Dako) incubat durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment es van fer dos rentats de 10 minuts amb TBST i dos més amb TBS. La detecció es va realitzar per quimioluminescència incubant les membranes durant 1 minut amb ECL (Pierce) en la foscor i utilitzant ChemiDoc Imager (Bio-Rad).

3.3.4 Efecte de PRP6-HO7 sobre Mo-DCs

3.3.4.1 Obtenció de Mo-DCs

3.3.4.1.1 Detecció de SARS-CoV2 per RT-qPCR en mostres de sang

Arrel de la pandèmia de SARS-CoV2, les mostres de sang obtingudes durant aquesta etapa (2020-2021) van haver de ser analitzades mitjançant RT-qPCR per confirmar l'absència de SARS-CoV2.

Per a l'extracció d'RNA víric a partir de plasma humà es va fer servir el *kit Maxwell® RSC viral total nucleic acid purification* (Promega) seguint les instruccions del fabricant. Així, en primer lloc es va obtenir el plasma centrifugant la sang a 1 500 g durant 20 minuts sense fre. A 200 µl de plasma es van afegir 220 µl de solució de lisi (200 µl de tampó de lisi amb 20 µl de solució de proteïnasa K). A continuació es va fer un vòrtex i es va incubar aquesta mostra en un bloc sec a 56°C durant 10 minuts.

Els cartutxos que proporciona el *kit* d'extracció es van carregar d'acord amb les instruccions i es va procedir a l'extracció automatitzada amb l'instrument *Maxwell® RSC* (Promega). Un cop realitzada l'extracció d'RNA els tubs d'elució amb 50 µl es van centrifugar a 12 000 g durant 2 minuts per precipitar les possibles partícules magnètiques presents. A continuació, amb el propòsit de detectar la presència de SARS-CoV2 en les mostres d'RNA es va realitzar una RT-qPCR d'un sol pas amb la *TaqPath 1-step* RTq-PCR (ThermoFisher) que conté en el mateix tub la transcriptasa inversa MMLV termoestable, dNTPs, UNG, ROX i la polimerasa. Els *primers* utilitzats

Metodologia

van ser 2019-nCoV N1, 2019-nCoV N2 i RNasa P Humana (RP) (CDC (2019-nCoV-EUA-01), Atlanta, Geòrgia).

Com a control positiu es va utilitzar una mostra de 2019-nCoV_N_Positive control (IDT, Coralville, IA) en una dilució 1:1 000 en Tris a 10 mM i àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) a 1 mM (tampó TE). Com a control negatiu es va fer servir aigua lliure de nucleases.

Finalment es va configurar el perfil tèrmic d'amplificació corresponent a aquesta RT-qPCR segons s'especifica en la **taula 19** i es va executar en l'instrument 7900HT Real-Time PCR (Applied Biosystems, ThermoFisher) equipat amb el programa SDS 2.4.

Etapa	Pas	Temperatura	Temps
Hold	Incubació UNG	25°C	2 minuts
Hold	Retrotranscripció	50°C	15 minuts
Hold	Activació de la polimerasa	95°C	2 minuts
Cicles (45)	Desnaturalització	95°C	3 segons
	Unió <i>assay</i> i amplificació	55°C	30 segons

Taula 19. Perfil tèrmic de la RT-qPCR per a la detecció de SARS-CoV2

Configuració del perfil tèrmic de la RT-qPCR per a la detecció de SARS-CoV2 en mostres de plasma utilitzant la *TaqPath 1-step* RT-qPCR (ThermoFisher). UNG: uracil-N glicosilasa.

Un cop confirmada l'absència de SARS-CoV2 en els plasmes sanguinis es va poder procedir amb els experiments corresponents.

3.3.4.1.2 Aïllament de PBMCs de sang perifèrica

A partir de sang total de donants sans, obtinguda del Banc de Sang i Teixits (Barcelona, Espanya) es van aïllar, en primer lloc, les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) formades principalment per limfòcits, monòcits i DCs, separant-les així de les plaquetes, eritròcits i cèl·lules polimorfonuclears (granulòcits).

Amb aquest objectiu, la sang total es va centrifugar a 1 500 g durant 20 minuts sense fre. Posteriorment, es van obtenir dues fases: la fase superior és el plasma i s'elimina per purificar la fracció cel·lular al màxim. La fase inferior o cel·lular és de color vermell i conté principalment eritròcits. En la interfase és on trobem les plaquetes i els leucòcits. Per tant, un cop descartada la fracció superior, es va recollir la capa leucocitària i es va diluir en PBS (dilució 1:2). Després es van realitzar gradients de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, AB), repartint cadascun dels tubs en dos tubs nous que contenen 15 ml de Ficoll, deixant relliscar el contingut poc a poc en els laterals del tub per no barrejar la suspensió cel·lular amb el Ficoll. A continuació, els tubs es van centrifugar a 400 g durant 25 minuts sense fre. Un cop centrifugats es van obtenir diferents fases. La fase superior conté el plasma restant i a sota trobem el Ficoll i els eritròcits precipitats. En la interfase d'aquestes dues parts, trobem una capa blanca que conté les PBMCs. Aquest procés està representat en la **figura 27**.

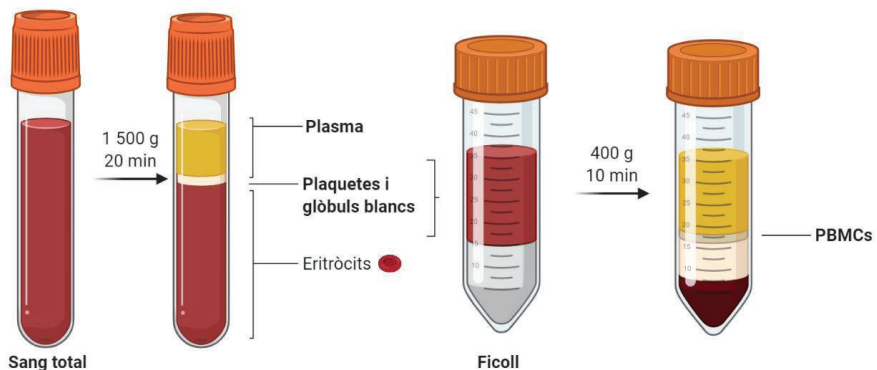


Figura 27. Representació gràfica del procés d'obtenció de PBMCs a partir de sang total

Aquesta capa de cèl·lules es va recollir utilitzant una pipeta Pasteur i es va dipositar en un tub nou. Finalment es van realitzar dos rentats amb PBS per eliminar l'excés de Ficoll i les plaquetes restants, resultants de l'extracció de la capa mononuclear, centrifugant durant 10 minuts a 400 g. Amb el pellet resultant, es va procedir a la purificació dels monòcits CD14⁺.

Metodologia

3.3.4.1.3 Obtenció i purificació de monòcits CD14⁺

Per a tots els assajos funcionals, els monòcits CD14⁺ humans es van aïllar de les PBMCs utilitzant la tecnologia MACS[®] (Miltenyi Biotec). Aquesta tècnica utilitza anticossos monoclonals de ratolí anti-CD14 humà acoblats a microesferes magnètiques que després són captades utilitzant un camp magnètic.

L'antigen CD14 pertany al complex heteromèric del receptor per LPS, format per almenys CD14, TLR4 i MD-2. La unió de l'anticòs a CD14 no desencadena la transducció de la senyal degut a que CD14 no presenta domini citoplasmàtic. CD14 es troba molt expressat en monòcits i macròfags humans, i lleugerament en neutròfils i algunes DCs mieloides (319).

Així, l'aïllament dels monòcits es va dur a terme per selecció positiva, marcant aquestes cèl·lules amb microesferes magnètiques, a raó de 20 µl de microesferes/10⁷ cèl·lules totals amb una incubació de 15 minuts a 4°C per permetre la unió a CD14. Posteriorment, es van afegir 5 ml de tampó PBS amb EDTA a 2 mM i un 0.5% (p/v) de BSA sobre les cèl·lules i es van centrifugar durant 10 minuts a 400 g. La columna MACS LS+ es va equilibrar amb el mateix tampó i posteriorment el *pellet* de cèl·lules que es va resuspendre en 500 µl d'aquest tampó i es va passar a través d'un filtre cap a la columna col·locada en una base amb un camp magnètic. D'aquesta manera, les cèl·lules que presenten CD14 queden retingudes en la columna per la força magnètica, mentre que les no marcades passen a través. Després de realitzar tres rentats amb el tampó, la fracció cel·lular retinguda es va eluir, traient la columna de l'imant, afegint 5 ml de tampó i empenyent el volum a través de la columna amb l'ajuda d'un èmbol, obtenint finalment les cèl·lules marcades. Aquesta suspensió cel·lular es va rentar, centrifugant les cèl·lules 10 minuts a 400 g i el *pellet* resultant es va resuspendre amb 5 ml de tampó PBS amb EDTA a 1 mM.

3.3.4.1.4 Quantificació i avaluació de la puresa dels monòcits CD14⁺ obtinguts

El número i la puresa de les cèl·lules CD14⁺ van ser analitzats utilitzant les microesferes *Perfect Count* (Cytognos SL, Salamanca, Espanya) i marcatge amb anticòs anti-CD14 conjugat amb FITC (TÜK4) i el seu isotip control anti-IgG2a conjugat amb FITC

(S43.10) (els dos de Miltenyi) amb el subseqüent anàlisi per citometria de flux (FACSCanto II equipat amb el software FACSDiva (Beckton Dickinson)). Aquest mètode permet obtenir una població enriquida en monòcits amb una puresa superior al 90%.

Així, 20 µl de cèl·lules obtingudes es van marcar en 40 µl de PBS amb 0.8 µl de l'anticòs anti-CD14 conjugat amb FITC durant 15 minuts. Posteriorment la reacció es va aturar amb 120 µl de PBS i es va afegir un volum de microesferes de comptatge igual al de cèl·lules marcades, és a dir, 20 µl de microesferes *Perfect Count*.

Les *Perfect Count* són un sistema basat en microesferes de dues mides (A i B) amb densitats per sobre i per sota de les densitats de les cèl·lules de la sang. Els dos tipus d'esferes tenen diferents característiques de dispersió de la llum, fluorescència i densitat. Per això, són fàcilment detectables i diferenciables per citometria de flux:

- Microesferes de tipus A: tenen una mida de 6.4 µm i són excitable a 506 nm.
- Microesferes de tipus B: tenen una mida de 6.36 µm i són excitable a una longitud d'ona que va de 365 nm a 650 nm.

Un cop adquirida la mostra en el citòmetre de flux, cal comprovar que la proporció de les subpoblacions d'esferes presenta un rang acceptable de variabilitat (aproximadament hauria d'haver un 50% de cada tipus de microesferes).

El càlcul del número absolut de la població cel·lular d'interès es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$\text{Comptatge} \left(\frac{\text{cèl·lules}}{\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cèl·lules de la subpoblació diana comptada}}{\text{n}^\circ \text{ total de microesferes comptades}} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de microesferes}}{\mu\text{l}}$$

, on el n° de microesferes/µl ve especificat pel fabricant.

3.3.4.1.5 Diferenciació de monòcits a DCs

2.5x10⁵ monòcits CD14⁺ es van cultivar en plaques de 24 pous en 500 µl de medi complet a 37°C i un 5% de CO₂. Les Mo-DCs es van generar afegint factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags recombinant humà (rhGM-CSF) (800 U/ml) i

Metodologia

interleuquina-4 recombinant humana (rhIL-4) (500 U/ml; les dues de Gentaur, Kampenhout, Bèlgica) a dia 0 i dia 5 de cultiu cel·lular. La morfologia de les iDCs es va anar avaluant per microscòpia de contrast de fase durant els diferents dies de cultiu.

Les diferents isoformes de C4BP (C4BP(β +), C4BP(β + nuu i C4BP(β -)) es van afegir a una concentració de 12 mM, mentre que les variants obtingudes per enginyeria genètica, les PRP (PRP5/8-HO7, PRP6-HO7 i PRP6-NO) es van afegir a una concentració variable segons s'especifica en cada experiment, totes a dia 0, en els monòcits en diferenciació.

3.3.4.2 Maduració de les DCs

Per assolir la maduració de les DCs sense tractament o tractades amb les molècules derivades de C4BP, a dia 5 de cultiu cel·lular es va fer un canvi de medi, recollint el medi de cada pou amb les cèl·lules no adherides, centrifugant durant 10 minuts a 400 g i retornant-les a la placa amb RPMI complet amb rhGM-CSF i rhIL-4 afegint els diferents tipus d'estímuls de maduració durant 48 hores. Com a control negatiu, es van utilitzar cèl·lules sense l'estímul de maduració (iDC). La morfologia cel·lular es va continuar avaluant durant els dos dies de maduració.

Els estímuls de maduració que es van utilitzar generalment al llarg d'aquest estudi van ser:

- LPS (*Lipopolysaccharides from Escherichia coli* 055.B5, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemanya) a 5 μ g/ml.
- Gardiquimod (imidazoquinolina; lligand de TLR7) (Invivogen) a 10 μ g/ml.

3.3.4.3 Assaig d'activació via TLRs

En aquest assaig, la maduració de les Mo-DCs es va induir durant 48 hores amb un panell d'agonistes que activaven tots els diferents TLRs: Pam3CSK4 (activador de TLR1/2) a 300 ng/ml, HKLM (Heat-killed *Listeria monocytogenes*) (TLR2) a 10^8 cèl·lules/ml), Poly (I:C) HMW (*High molecular weight polyinosine-polycytidylic acid*) i Poly (I:C) LMW (*Low molecular weight polyinosine-polycytidylic acid*) (ambdós TLR3)

a 10 µg/ml, LPS-EK (LPS *E. coli* K12) (TLR4) a 5 µg/ml, FLA-ST (Flagellin *S. typhimurium*) (TLR5) a 2 µg/ml, FSL-1 (TLR6/2) a 100 ng/ml, gardiquimod (TLR7) a 10 µg/ml, ssRNA40/LyoVec (TLR8) a 5 µg/ml i *E. coli* ssDNA/LyoVec (TLR9) a 10 µg/ml (tots d'Invivogen).

3.3.4.4 Cultiu amb sèrum humà autòleg

Per avaluar la influència del sèrum humà sobre l'activitat immunomoduladora de C4BP(β-) i de PRP6-HO7, les Mo-DCs humanes es van tractar amb aquestes proteïnes a les concentracions indicades i es van co-incubar amb un 50% de sèrum humà autòleg inactivat amb calor (56°C, 1 hora) al llarg del seu procés de diferenciació i maduració.

3.3.4.5 Citometria de flux

Per avaluar l'efecte dels diferents tractaments en la maduració de les Mo-DCs, es va analitzar el fenotip de superfície cel·lular utilitzant el següents anticossos: anti-CD86 conjugat amb PE (FM95), anti-CD83 conjugat amb aloficocianina (APC) (REA714), anti-CD80 conjugat amb PE (REA661), anti-CD40 conjugat amb PE (HB14) i anti-HLA-DR conjugat amb FITC (REA805) (Miltenyi Biotec). També es van fer servir els seus respectius isotips com a control: anti-IgG1 conjugat amb PE (IS5-21F5) i REA anticòs control (S) anti-IgG1 humà (Miltenyi Biotec).

Així, després de rentar les cèl·lules amb PBS, les cèl·lules es van marcar amb les quantitats establertes de cada mAb (0.4 µl de CD86 i 0.6 µl de la resta) durant 15 minuts a temperatura ambient en 60 µl de PBS. La reacció de marcatge es va aturar afegint 120 µl de PBS. Per excloure restes cel·lulars es van tenir en compte els paràmetres de FSC i SSC. També es va fer servir marcatge amb 7-AAD (ThermoFisher) per avaluar la viabilitat cel·lular. A partir de la pandèmia de SARS-CoV2, per avaluar la viabilitat cel·lular i fixar les cèl·lules, es va canviar el marcatge de viabilitat pel kit *LIVE/DEAD™ Fixable near-IR dead cell stain* (Invitrogen) i fixació amb 150 µl de tampó fixador (*Fixation Buffer*, de Biolegend). Els resultats es van analitzar

utilitzant el citòmetre FACSCanto II equipat amb el software FACSDiva (Becton Dickinson). Els anàlisis posteriors es van realitzar amb el software FlowJo (Flowjo LLC).

3.3.4.6 Avaluació de la capacitat endocítica de les Mo-DCs

La major part de les proteïnes immunogèniques requereixen el processament per part de les APCs i la subseqüent expressió en superfície abans de poder ser reconegudes per les cèl·lules Th. El processament antigènic involucra la internalització de la proteïna, desnaturalització i proteòlisi, seguit de l'associació dels pèptids resultants amb les molècules MHC i la seva expressió en superfície.

Així, la capacitat endocítica mediada per receptor en les Mo-DCs es pot determinar per citometria de flux utilitzant el *dye* *DQ-Ovalbumin* conjugada amb *BODIPY FL* (*DQ-OVA*) (Molecular Probes, Leiden, Països Baixos) que és un conjugat d'ovoalbúmina amb *self-quenching*. Aquest substrat està marcat amb el *dye* *BODIPY FL* que exhibeix una fluorescència fotoestable, brillant i insensible a les variacions de pH (en el rang de 3 a 9). Està dissenyat especialment per a l'estudi de processament i presentació d'antígens, ja que l'ovoalbúmina és internalitzada per la via d'endocitosi mediada pel receptor de manosa i després de la digestió proteolítica, els fragments alliberats presenten fluorescència de color verd brillant amb una longitud d'ona d'excitació de 505 nm i d'emissió a 515 nm.

Per mesurar l'activitat endocítica de les Mo-DCs, a dia 5 de diferenciació, 2×10^5 cèl·lules/ml es van resuspendre en 60 μ l de medi complet i es van incubar amb 4 μ l de *DQ-OVA* (1 mg/ml) a 37°C durant 30 minuts en la foscor. Per determinar l'endocitosi no específica de *DQ-OVA* per part de les Mo-DCs, la mateixa quantitat de cèl·lules van ser incubades a 0°C durant 30 minuts en la foscor (control negatiu). Passat el temps d'incubació la reacció es va aturar amb 150 μ l de tampó FACS fred. Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb aquest tampó i finalment la fluorescència es va analitzar per citometria de flux.

3.3.4.7 Assaig de quimiotaxi

La migració de les Mo-DCs, diferenciades en presència de C4BP(β +), C4BP(β -) o PRP6-HO7 i madurades amb LPS durant 48 hores, condicionada per la quimiocina CCL21 va ser avaluada utilitzant plaques de 12 pous amb *transwells* (Costar, Corning, NY), com es troba representat en la **figura 28**. Aquestes plaques consten de dues cambres separades per un filtre de policarbonat amb un porus de 8 μ m. En primer lloc, els filtres es van equilibrar per tal de millorar la unió de les cèl·lules, afegint medi complet als *transwells* i incubant la placa durant 1 hora a 37 °C. Posteriorment, la cambra inferior dels diferents pous es va omplir amb 400 μ l de medi complet sense o amb CCL21 (200 ng/ml). A continuació, es van afegir 1.6×10^4 DCs cultivades en les diferents condicions experimentals, en 100 μ l de medi complet sobre la cambra superior i es van incubar a 37 °C amb un 5% de CO₂ durant 2 hores. Les cèl·lules que van migrar a la cambra inferior es van recollir i van ser comptades per citometria de flux, adquirint esdeveniments durant un període fix de temps d'1.5 minuts. Els assajos de migració per a totes les condicions es van realitzar per duplicat. Els valors es van obtenir com número total de cèl·lules que van migrar.

Per a aquest assaig, es va comprovar en paral·lel l'expressió del receptor de CCL21, CCR7, en les Mo-DCs estimulades amb LPS, per citometria de flux, amb un anticòs anti-CCR7 conjugat amb Alexa Fluor 488 (G043H7) i el seu respectiu isotip control anti-IgG2ak conjugat amb Alexa Fluor 488 (MOPC-173) (ambdós de Biolegend).

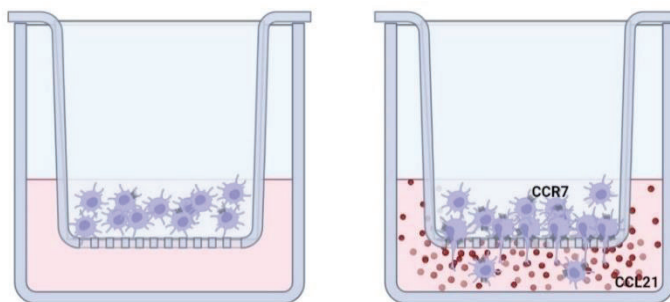


Figura 28. Representació gràfica de l'assaig de quimiotaxi amb Mo-DCs

Assaig de quimiotaxi en Mo-DCs en plaques amb *transwells* en absència de la quimiocina CCL21 (esquerra) o afegint CCL21 al medi complet (dreta).

3.3.4.8 Proliferació de limfòcits T al·logènics

3.3.4.8.1 Obtenció i purificació de limfòcits T CD3⁺

La molècula CD3 té la funció biològica d'intervenir en l'expressió del TCR en la superfície de la cèl·lula i es troba en associació amb aquest receptor per generar una activació dels limfòcits T i la transducció de les senyals d'activació. S'expressa específicament en timòcits i cèl·lules T.

Els limfòcits T CD3⁺ es van seleccionar a partir de PBMCs provinents de sang perifèrica mitjançant microesferes magnètiques realitzant una selecció negativa amb el *kit MojoSort™ Human CD3 T Cell Isolation* (Biolegend). Amb la tècnica de selecció negativa, les cèl·lules no-CD3 són deplecionades per incubació de la mostra amb el *cocktail* d'anticossos conjugats amb biotina anti- CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 i CD235, seguit d'una incubació amb microesferes magnètiques conjugades amb estreptavidina. La fracció cel·lular que uneixen els anticossos queda marcada magnèticament i retinguda per utilització d'un separador magnètic. Les cèl·lules T CD3⁺ romanen sense ser unides per cap anticòs i es recullen per decantació en un tub.

Per realitzar aquesta tècnica, les cèl·lules es van resuspendre a raó de 10⁸ cèl·lules/ml en PBS. Per cada 100 µl de la suspensió cel·lular separada en un tub de poliestirè es van afegir 10 µl de *cocktail* d'anticossos conjugats amb biotina i es va incubar 15 minuts en gel. Posteriorment, es van barrejar les nanopartícules per assegurar la formació d'una suspensió uniforme i es van afegir a raó de 10 µl per cada 100 µl de cèl·lules. Es van incubar 15 minuts en gel i es va afegir 2.5 ml del tampó *MojoSort™*. El tub es va introduir dins l'imant durant 5 minuts. Passat aquest temps, es va recuperar la fracció sobrenedant on romanen les cèl·lules CD3⁺ girant l'imant, per decantació, sense treure el tub. Les cèl·lules marcades magnèticament romanen enganxades a les parets del tub gràcies al camp magnètic creat per l'imant. La fracció obtinguda es va centrifugar durant 10 minuts a 400 g i els pellets es van resuspendre en PBS.

Les cèl·lules T CD3⁺ es van obtenir amb un 90% de puresa, com es va comprovar per marcatge amb l'anticòs anti-CD3 conjugat amb FITC (UCHT1) i el seu isotip control

anti-IgG1k conjugat amb FITC (MOPC-21) (ambdós de Tonbo Biosciences, San Diego, CA) per citometria de flux.

3.3.4.8.2 Reacció limfocitària mixta

El marcatge amb èster de succinimidil-carboxifluoresceïna (CFSE) permet conèixer si les cèl·lules en cultiu estan proliferant. El CFSE consisteix en una molècula de fluoresceïna amb dos grups acetat i un grup funcional èster succinimida. En aquest estat, és permeable, incolor i no fluorescent. Després d'entrar a la cèl·lula, esterases intracel·lulars eliminen els grups acetat, transformant el compost en èster de succinimidil-carboxifluoresceïna que és altament fluorescent i no permeable a la membrana cel·lular. L'excés de compost sense conjugat i els productes col·laterals difonen passivament al medi extracel·lular, on poden ser rentats i eliminats. El marcatge és heretat per les cèl·lules filles després de la divisió cel·lular, i per tant, després de cada divisió cel·lular, la fluorescència de les cèl·lules filles és de la meitat. Els pics aproximats d'excitació i emissió d'aquest producte després de la hidròlisi són d'unes longituds d'ona de 492 nm i 517 nm respectivament.

En aquest assaig, les cèl·lules T al·logèniques van ser marcades amb el dye fluorescent intracel·lular CFSE (Celltrace™; Invitrogen, ThermoFisher) incubant cada 10^6 cèl·lules en 100 µl de PBS amb 1 µl de CFSE (1.8 µM en DMSO) durant 20 minuts a temperatura ambient i agitació suau en la foscor. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar amb 5 vegades el volum de marcatge amb medi complet per inactivar el CFSE que no havia reaccionat. Finalment les cèl·lules es van centrifugar i resuspendre en medi complet a una densitat cel·lular de 10^5 cèl·lules/100 µl/pou i es van cultivar en plaques de fons rodó de 96 pous. Al dia següent, les cèl·lules T van ser co-cultivades amb Mo-DCs pre-tractades amb C4BP(β+), C4BP(β-) o PRP6-HO7 i activades amb LPS, en una *ratio* DC:T d'1:5 en medi complet. L'al·loproliferació de les cèl·lules T es va determinar després de 5 dies de co-cultiu mitjançant la pèrdua seqüencial de cèl·lules fluorescents quantificada per citometria de flux.

3.3.4.8.3 Tinció de citocines intracel·lulars

En una placa anàloga, les cèl·lules dels co-cultius van ser estimulades amb 50 ng/ml de *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA) junt amb 500 ng/ml de ionomicin durant 5 hores en presència de 10 µg/ml de *brefeldin A* (totes de Sigma Aldrich). Després de l'estimulació, les cèl·lules es van rentar amb PBS, es van fixar i permeabilitzar amb el *kit IntraStain* (Dako, Agilent) i es van incubar durant 30 minuts a temperatura ambient amb un anticòs anti-INF-γ humà conjugat amb APC (45-15) i el seu isotip control anti-IgG1 conjugat amb APC (IS5-21F5) (els dos de Miltenyi). Les cèl·lules es van rentar i analitzar per citometria de flux.

3.3.4.9 ELISA: secreció de citocines IL-12p70, TNF-α i IL-10

Les concentracions d'IL-12p70, TNF-α i IL-10 humanes van ser determinades a partir dels sobrenedants dels cultius de Mo-DCs tractades amb les isoformes de C4BP i les proteïnes PRP utilitzant els *kits DuoSet* d'ELISA respectius (R&D Systems) d'acord amb les instruccions del fabricant. En aquests *kits*, s'ha de pre-incubar la placa amb un anticòs específic de captura de la citocina corresponent i un cop afegides les mostres es realitza una incubació amb un anticòs biotinitat. Posteriorment s'afegeix estreptavidina conjugada amb HRP i el substrat TMB per a la reacció enzimàtica colorimètrica. L'absorbància es va mesurar a 450 nm i 560 nm en el lector de plaques Victor X5 (PerkinElmer).

3.3.5 Efecte de PRP6-HO7 en Mo-DCs i Mo-macròfags obtinguts de pacients amb LES

Els pacients de LES derivats de la Unitat de Nefrologia i Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Espanya) es van sotmetre a una extracció de sang i les seves PBMCs es van obtenir de la mateixa manera com s'ha descrit en l'apartat **3.3.4.1.2** per als donants sans.

En aquest cas, els monòcits es van diferenciar a Mo-DCs però també a macròfags (Mo-macròfags) suplementant el medi complet amb rhGM-CSF (650 IU/ml) a dia 0 de cultiu cel·lular fins a dia 6. El fenotip de superfície cel·lular de les Mo-DCs sense estimular o estimulades per a la seva maduració amb LPS o gardiquimod es va

analitzar per citometria de flux amb els anticossos especificats en la secció 3.3.4.5 i els Mo-macròfags es van analitzar amb l'anticòs anti-CD64 conjugat amb APC (10.1.1) i el seu isotip control anti-IgG1 conjugat amb APC (IS5-21F5) (els dos de Miltenyi).

Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) d'acord amb les directrius institucionals i la Declaració de Helsinki, així com el consentiment informat signat pels pacients.

3.3.6 Efecte de PRP6-HO7 com a tractament experimental en el model murí de CU aguda induïda per DSS

En aquest model murí de CU induïda per DSS es van fer servir 28 ratolins femelles de la soca C57BL/6 (Charles River Laboratories) de 7 setmanes d'edat (18-21 g de pes). El model de CU es va establir de la mateixa manera que en l'estudi preliminar, per addició de DSS en l'aigua per beure a una concentració del 2%. Els animals del grup blanc (sense malaltia, n=4) van rebre aigua regular durant els 9 dies d'experiment. Els ratolins del grup DSS (n=6) va ser injectats a dia 0 amb una dosi única de PBS (0.15 ml de volum). Els animals dels grups C4BP(β -) i PRP6-HO7 (n=6, en cada grup) van ser injectats amb 60 μ g del tractament corresponent per via subcutània (0.15 ml) els dies 4, 6 i 8. Com a tractament de referència es va utilitzar minociclina (n=6), administrada diàriament per via oral als animals (50 mg/Kg o 10 ml/Kg) com es detalla en la **figura 29**. El procediment experimental es va realitzar com s'ha especificat en l'apartat 3.2.2.

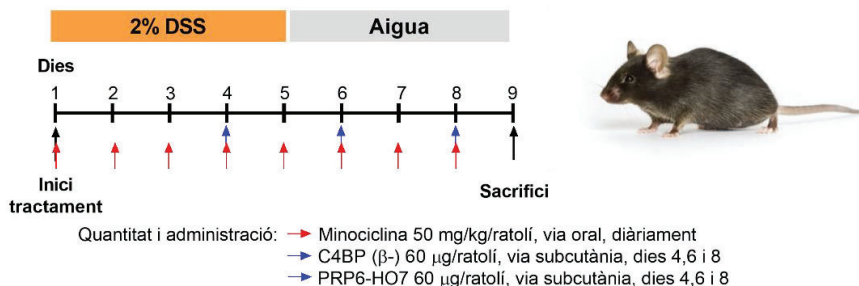
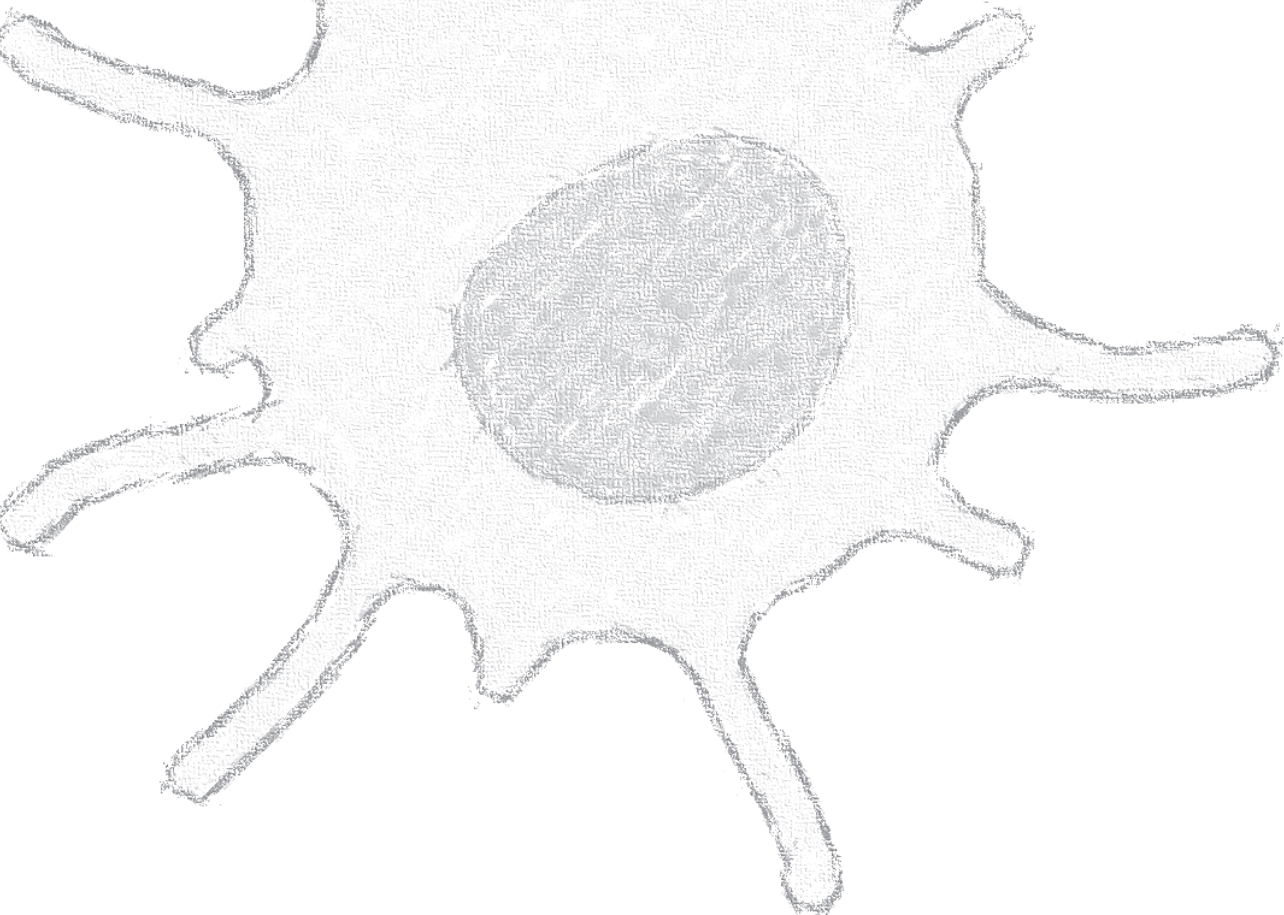


Figura 29. Pauta d'administració en el model murí de CU induïda per DSS en l'avaluació del potencial de C4BP(β -) i PRP6-HO7

Esquema de la pauta d'administració per la injecció subcutània de C4BP(β -) i PRP6-HO7 (fletxes blaves) i l'administració oral de minociclina (fletxes vermelles) en el model murí de CU induïda per DSS en C57BL/6.

3.3.7 Anàlisi estadístic

Els anàlisis estadístics i la visualització gràfica de les dades es va realitzar utilitzant el programa GraphPad Prism 6.0 (Graphpad software, Inc). Per comparar els valors de les MFIs, el percentatge de cèl·lules T CFSE negatives i d'INF- γ positives i els nivells de citocines en les diferents condicions experimentals respecte a una condició referent es va fer servir l'anàlisi unidireccional de la variància per mostres aparellades amb la correcció per comparacions múltiples de Dunnett. Els resultats dels assajos de migració amb o sense CCL21 van ser comparats amb anàlisi bidireccional de la variància amb la correcció de Dunnett. Per comparar les MFIs i els percentatges de cèl·lules positives entre dues condicions, en els assajos realitzats amb Mo-DCs i Mo-macròfags de pacients de LES es va fer servir el test t d'una sola mostra per mostres aparellades, mentre que la relació entre aquests valors d'expressió dels marcadors de superfície cel·lular i les característiques clíniques es va avaluar pel test de correlació de Spearman. En el model animal de CU induïda per DSS, les dades de pes corporal i les dades relatives al DAI es van analitzar utilitzant l'anàlisi bidireccional de la variància amb la correcció *post-hoc* de Holm-Šídák per comparacions múltiples. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SD. El grup utilitzat com a referència s'especifica en cada cas. En tots els casos, un p-valor < 0.05 es va considerar significatiu.



4. RESULTATS

4.1 L'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) limita el desenvolupament de la NL

4.1.1 Avaluació de la puresa de les proteïnes C4BP(β +) i C4BP(β -)

La puresa de les glicoproteïnes C4BP(β +) i C4BP(β -) va resultar major del 85%, com es va comprovar per SDS-PAGE en gel de Tris-Acetats amb un gradient del 3-8% (NuPAGE; ThermoFisher) amb 6 μ g de proteïna/carril i tinció amb Coomassie Blue (Figura 30).

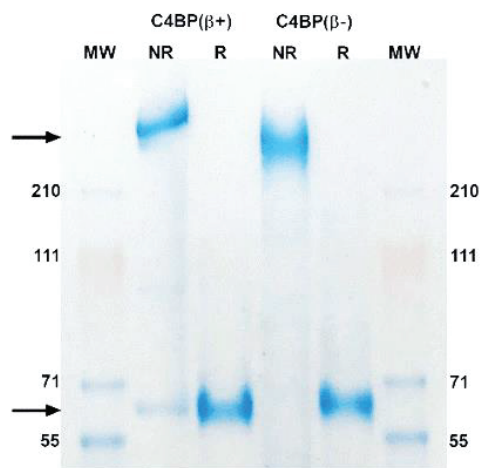


Figura 30. Anàlisi electroforètic de les isoformes C4BP(β +) i C4BP(β -) humanes purificades de plasma

Ambdues proteïnes purificades de plasma es van fraccionar en un gel SDS-PAGE amb un gradient del 3-8% sota condicions no reductores (NR) i reductores (R). Sota condicions NR, C4BP(β +) és un hetero-oligòmer compost per 7 cadenes α idèntiques i una cadena β , i C4BP(β -) és un homo-oligòmer compost exclusivament per 7 cadenes α idèntiques. Totes les cadenes es troben unides covalentment pel seu extrem C-terminal donant lloc a una estructura de tipus aranya en ambdues isoformes, que migren com una banda d'uns 570 kDa o 530 kDa (fletxa superior). La cadena β sempre es troba formant un complex amb la PS anticoagulant dependent de vitamina K (70 kDa) que s'identifica en la banda inferior sota condicions no reductores. Tanmateix, sota condicions reductores, la banda d'uns 70 kDa (fletxa inferior) correspon al desassemblatge de les cadenes α en el cas de la isoforma C4BP(β -), i al desassemblatge les cadenes α i PS en el cas de la isoforma C4BP(β).

4.1.2 C4BP(β -) confereix un fenotip anti-inflamatori en BM-DCs

Com ja es va reportar prèviament (94), C4BP(β -) confereix un fenotip semi-madur i anti-inflamatori en Mo-DCs procedents d'individus sans estimulades amb LPS. Per tant, el primer que s'havia de fer, era confirmar l'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) humana en cèl·lules murines. Així, es va comprovar que el tractament amb C4BP(β -) evita la sobre-expressió de les molècules co-estimuladores CD80 i CD86 en BM-DCs de ratolí, 24 hores després d'haver estat estimulades amb gardiquimod, un agonista de TLR7, receptor rellevant en la patogènesi de la NL (320) (Figura 31).

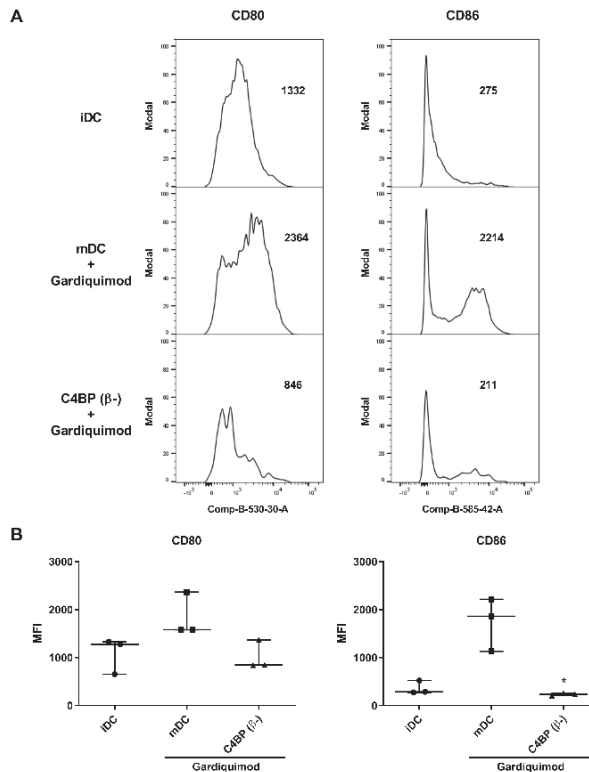


Figura 31. C4BP(β -) humana disminueix l'expressió de les molècules co-estimuladores CD80 i CD86 en BM-DCs estimulades amb gardiquimod

Les BM-DCs murines van ser generades com es descriu a l'apartat 3.1.2 en Metodologia i van ser incubades durant el seu procés de diferenciació i maduració amb 5 μ g/ml de C4BP(β -) humana. La maduració de les BM-DCs es va assolir amb el tractament amb gardiquimod (10 μ g/ml). Les cèl·lules van ser recollides, rentades i analitzades per citometria de flux per a l'expressió dels marcadors de superfície cel·lular CD80 i CD86. (A) Es mostren els histogrames d'un experiment representatiu. La intensitat mediana de fluorescència (MFI) per a cada marcador s'indica en l'histograma. (B) MFIs per als marcadors de superfície cel·lular CD80 i CD86. Els resultats mostren la mediana \pm IQR de tres experiments independents. iDC, BM-DCs no tractades, immadures; mDC, BM-DCs no tractades, estimulades amb gardiquimod; C4BP(β -), BM-DCs tractades, estimulades amb gardiquimod. * $p < 0.05$ comparat amb mDC.

4.1.3 C4BP(β -) preserva la funció renal en el model murí NZBW F1

Per avaluar el potencial terapèutic de C4BP(β -) en la NL autoimmunitària experimental, es va dissenyar una pauta de tractament per via intraperitoneal en el model murí NZBW F1 amb aquesta proteïna plasmàtica purificada (**Figura 21** en la secció **3.1.5** en **Metodologia**).

La presència de proteïnúria és el signe més característic en els ratolins amb NL, ja que reflexa la disfunció renal i correlaciona estretament amb el desenvolupament i desenllaç de la malaltia. En els ratolins control, tractats amb PBS, els nivells de proteïnúria es van començar a incrementar en la setmana 28 i van progressar exponencialment cap a un nivell de proteïnúria severa (>300 mg/kg) cap a la setmana 34 (8.5 mesos d'edat) fins al final de l'estudi (setmana 36). En comparació, l'aparició de proteïnúria es va endarrerir fins al final de l'estudi en el grup de tractament amb C4BP(β -) i presentava una reducció significativa respecte els nivells que presentava el grup control ($p < 0.0001$) (**Figura 32A**). Així, ni el grup que va rebre el tractament estàndard, amb CYP, ni el grup que va ser tractat amb C4BP(β -) va desenvolupar nivells de proteïnúria notables al llarg del temps d'experiment. No obstant, cal destacar que es va produir un petit augment en el nivell de proteïnúria, particularment evident com a una albuminúria lleu (**Figura 32B**), que va aparèixer en la setmana 36 en el grup tractat amb C4BP(β -) en comparació amb el grup tractat amb CYP.

Aquesta disminució aparent en l'eficàcia terapèutica de la proteïna C4BP(β -) en els últims estadis de tractament podria reflectir un aclariment accelerat del tractament degut al desenvolupament d'una xeno-resposta immunitària contra la proteïna humana administrada en els ratolins immunocompetents NZBW F1 (321). D'acord amb això, es va comprovar que repetides dosis de C4BP(β -) van induir la producció d'anticossos específics anti-C4BP(β -) que van ser detectats en el sèrum dels ratolins tractats, amb un pic al voltant de la setmana 32 (**Figura 33**).

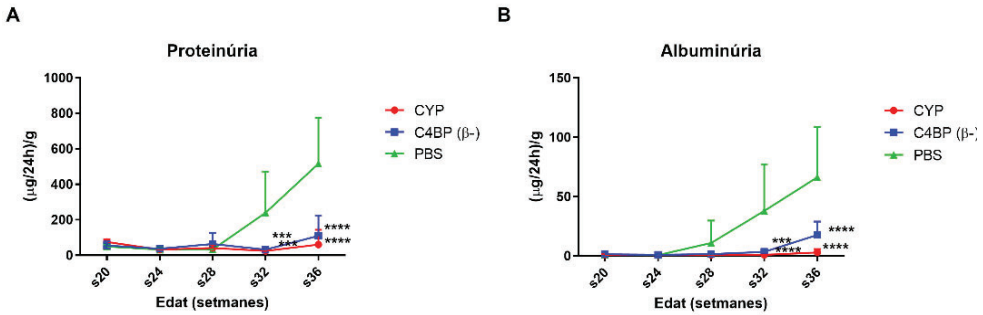


Figura 32. Determinació de la funció renal en el model NZBW F1

Els nivells de proteïnúria i albuminúria es van monitoritzar mensualment durant tot el curs de l'experiment i tots els animals es van sacrificar la setmana 36 (s36). **(A)** Els nivells de proteïna total en orina de 24 hores es van determinar per assaig d'unió de proteïnes pel mètode del vermell de pirogal·lol i molibdat i **(B)** l'albumina present en orina de 24 hores es va determinar per ELISA. Les dades estan normalitzades pel pes dels ratolins i s'expressen com a mitjana ± SD. n=4-8 ratolins per grup. ***p < 0.001, ****p < 0.0001 comparat amb els ratolins control tractats amb PBS.

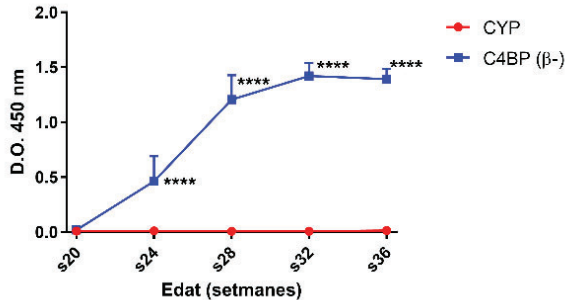


Figura 33. Desenvolupament d'anticossos anti-C4BP(β-) humana en els ratolins NZBW F1

Els nivells d'anticossos anti-C4BP(β-) humana en el sèrum dels ratolins van ser mesurats per ELISA des de la setmana 20 (pre-tractament) fins la setmana 36. La concentració d'anticossos anti-C4BP(β-) humana es va anar incrementant progressivament amb el temps en els ratolins tractats amb C4BP(β-). Els ratolins tractats amb CYP, utilitzats com a control negatiu, no van desenvolupar anticossos específics contra C4BP(β-) humana en cap moment del període d'estudi. Les dades s'expressen com a mitjana de la densitat òptica (D.O.) (450 nm) ± SD. n=6 ratolins per grup. ****p < 0.0001 comparat amb els ratolins tractats amb CYP.

En un conjunt d'experiments addicionals (Figura 22 en la secció 3.1.5 en Metodologia), es va confirmar que una dosi de 50 µg/ratolí de C4BP(β-) produïda en cèl·lules de mamífer HEK293 (rC4BP(β-)), administrada una vegada cada dues setmanes per via subcutània era suficient per millorar la funció renal i incrementar la supervivència dels ratolins nefrítics NZBW F1, tot i que la immunogenicitat desenvolupada era comparable entre ambdues proteïnes, C4BP(β-) purificada de plasma i rC4BP(β-) (Figura 34).

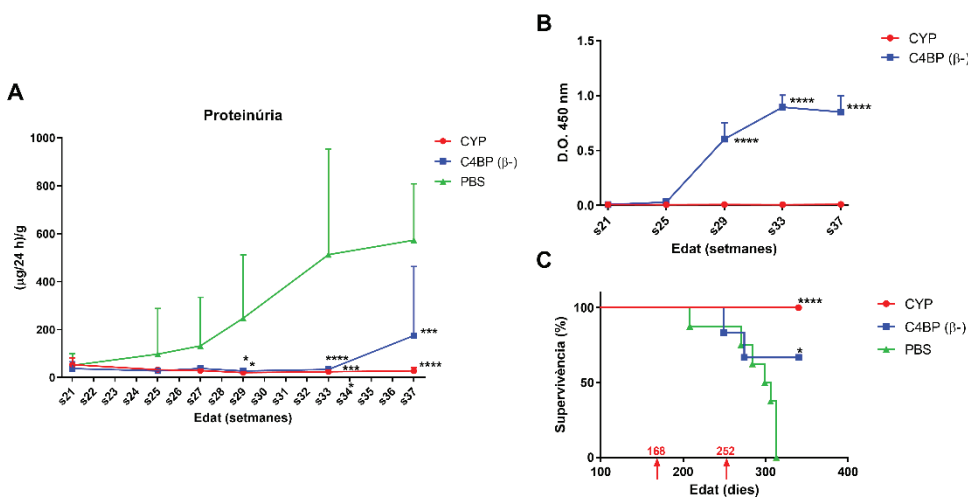


Figura 34. Determinació de la funció renal i supervivència dels ratolins NZBW F1 després de l'administració subcutània de rC4BP(β-) a dosi baixa

(A) Els nivells de proteinúria es van monitoritzar mensualment al llarg de tot l'estudi fins la setmana 37, excepte en els casos indicats expressament. La proteïna total en orina de 24 hores es va determinar pel mètode del vermell de pirogal·lol i molibdat. Les dades estan normalitzades pel pes corporal dels ratolins i s'expressen com a valors de la mitjana ± SD. n=6 ratolins per grup. *p < 0.05, ***p < 0.0001, ****p < 0.00001 comparat amb el grup control, ratolins tractats amb PBS. (B) Desenvolupament d'anticossos anti-rC4BP(β-) humana en els ratolins NZBW F1 tractats amb rC4BP(β-) al llarg de l'estudi. Els nivells sèrics de producció d'anticossos anti-rC4BP(β-) humana van ser mesurats per ELISA des de la setmana 21 (pre-tractament) fins la setmana 37. El nivell d'anticossos anti-rC4BP(β-) es va incrementar progressivament amb el temps en el grup de ratolins tractats amb rC4BP(β-). El grup que va rebre el tractament amb CYP, utilitzat com a control negatiu, no va desenvolupar anticossos anti-rC4BP(β-) humana en cap moment durant el període d'estudi. Les dades s'expressen com a mitjana de la D.O. (450 nm) ± SD. n=6 ratolins per grup. ****p < 0.0001 comparat amb els ratolins tractats amb CYP. (C) Corbes de supervivència de Kaplan-Meier del model murí de LES NZBW F1. Les corbes de supervivència acumulada mostren un 100% de supervivència en els ratolins tractats amb CYP (6/6), un 67% (4/6) en els ratolins tractats amb rC4BP(β-) a final de l'estudi (dia 337), mentre que tot els ratolins tractats amb PBS van morir cap al dia 313 (0/6). Les fletxes vermelles indiquen l'inici (dia 168) i el final (dia 252) del període de tractament. n=6 ratolins per grup. *p < 0.05, ****p < 0.0001, comparat amb els ratolins tractats amb PBS; test log-rank.

4.1.4 C4BP(β -) atenua el desenvolupament d'anticossos anti-dsDNA en el model murí NZBW F1

La concentració d'autoanticossos reflecteix directament el nivell d'autoimmunitat. En els ratolins NZBW F1 tractats amb PBS els nivells sèrics d'IgG totals anti-dsDNA es van incrementar progressivament des del cinquè mes fins al sisè mes d'edat (setmanes 20-24). En els següents 3 mesos, els nivells d'IgG anti-dsDNA van assolir la concentració més elevada i posteriorment va persistir (**Figura 35**). En comparació, els ratolins tractats amb C4BP(β -) van presentar uns nivells substancialment inferiors d'autoanticossos durant el període analitzat (setmanes 28-36; $p < 0.05$). Com s'esperava, els ratolins del grup amb el tractament estàndard, CYP, mostraven nivells d'autoanticossos reduïts.

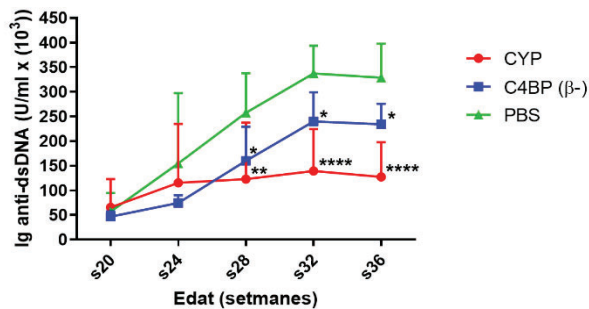


Figura 35. Producció d'autoanticossos en els ratolins NZBW F1 al llarg de l'estudi

Els nivells sèrics d'anticossos anti-dsDNA que correlacionen amb l'activitat de la malaltia es van mesurar per ELISA des de la setmana 20 (pre-tractament) fins la setmana 36. Les dades s'expressen com la mitjana \pm SD. $n=7$ ratolins per grup. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ comparat amb els ratolins tractats amb PBS.

4.1.5 C4BP(β -) millora l'afectació histològica renal dels ratolins NZBW F1

Tot i que els nivells de proteïnúria reflecteixen la severitat de la disfunció renal, l'estudi patològic revela, de forma directa, el dany tissular en la NL. Les característiques comunes de la nefritis severa inclouen canvis proliferatius en les cèl·lules mesangials i endotelials dels glomèruls renals, engruïment de la membrana capil·lar basal, presència d'infiltrats intersticials, atrofia tubular i grans cilindres proteics. La **figura 36** compara els trets histològics representatius a nivell renal en els diferents grups de tractament. Els ronyons dels ratolins de 9 mesos d'edat tractats amb PBS mostraven

els canvis nefrítics típics (**Figura 36A**), com ara glomèruls més grans i hipercel·lulars (**Figura 36B**), inflamació intersticial i presència de cilindres proteics al llarg de tot el còrtex renal, com era d'esperar pels nivells de proteinúria severa. D'altra banda, els talls histològics dels ronyons dels ratolins tractats amb C4BP(β -) i CYP presentaven una histologia glomerular, tubular i intersticial pràcticament intacta, amb una puntuació inferior en relació a la patologia (**Figura 36C**).

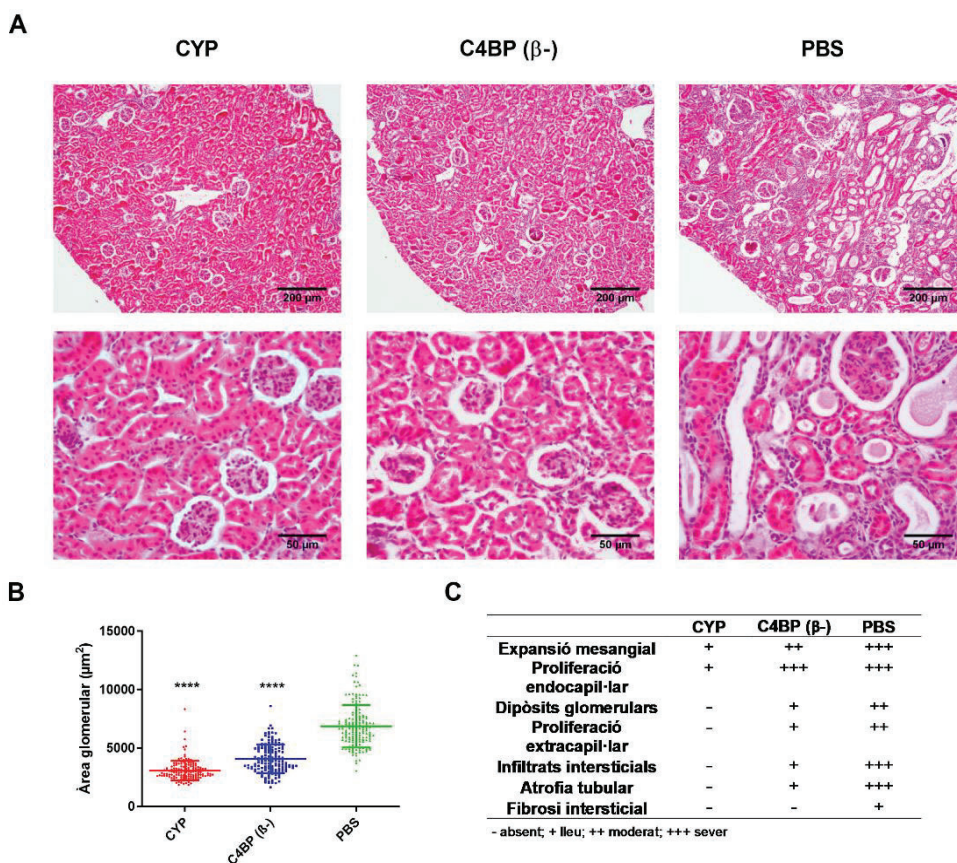


Figura 36. Avaluació de la histologia renal en el model de LES NZBW F1

(**A**) Seccions representatives del còrtex renal dels ratolins de 36 setmanes tractats amb CYP (esquerra), C4BP(β -) (centre) i PBS (dreta) amb tinció d'hematoxilina i eosina. Les imatges es mostren a petit augment (a dalt, escala: 200 μ m) i a gran augment (a baix, escala: 50 μ m). (**B**) Les dades obtingudes es van utilitzar per avaluar comparativament i de forma quantitativa, l'àrea glomerular i (**C**) semi-quantitativament, per puntuar les característiques histopatològiques indicatives de NL activa (expansió mesangial, proliferació endocapil·lar, dipòsits glomerulars, proliferació extracapil·lar i infiltrats intersticials) així com les lesions cròniques (atrofia tubular i fibrosi intersticial). **** $p < 0.0001$ comparat amb PBS.

Així, el tractament amb C4BP(β^-), que com hem vist, atenuava el desenvolupament d'anticossos anti-dsDNA, protegia els ronyons del dany induït pels autoanticossos.

4.1.6 Els dipòsits d'ICs i el nombre de cèl·lules apoptòtiques renals disminueixen significativament en els ratolins NZBW F1 tractats amb C4BP(β^-)

Els dipòsits d'ICs en els ronyons proporcionen evidència directa de la patogenicitat dels autoanticossos en l'òrgan diana i estan associats amb la nefritis en els ratolins NZBW F1 (322). Per a la seva avaluació, les crioseccions renals es van tenyir per a IgG i C3, els dos components majoritaris dels ICs. En els ratolins control, tractats amb PBS, es va evidenciar una acumulació pronunciada d'IgG i C3 en els glomèruls (**Figura 37**), que no es va observar en ambdós grups de tractament ($p < 0.0001$). Així, la presència de dipòsits d'ICs era consistent amb els canvis histopatològics observats en els ronyons.

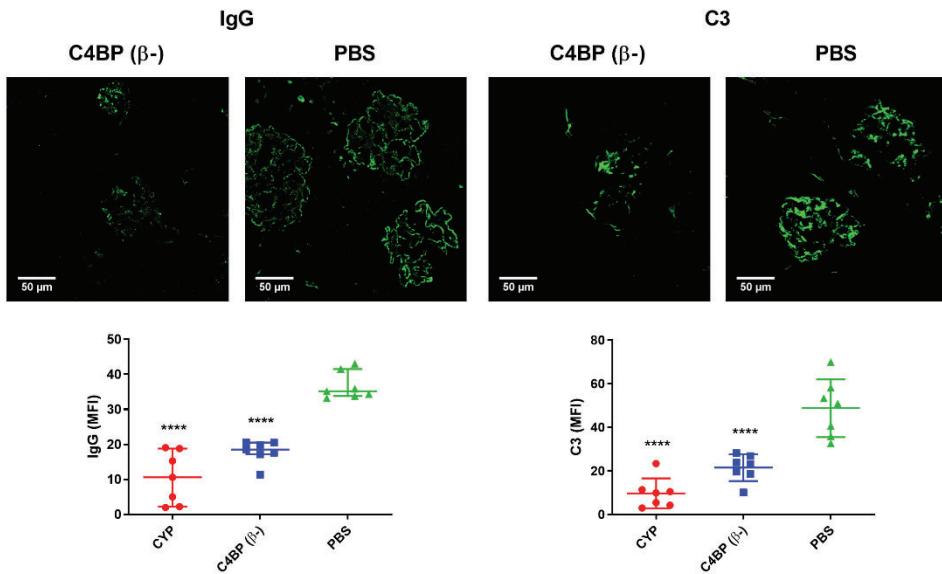


Figura 37. Anàlisi immunohistoquímica dels dipòsits d'IgG i C3 en el model murí de LES NZBW F1

Per a l'anàlisi de l'acumulació local d'IgG i C3 es va realitzar tinció fluorescent de les crioseccions renals. Es mostren imatges de fluorescència representatives de la tinció per IgG i C3 del còrtex renal dels ratolins NZBW F1 tractats amb C4BP(β^-) i amb PBS (panells superiors). El nivell de fluorescència es va expressar com a intensitat mitjana de fluorescència (MFI) \pm SD. $n=7$ ratolins per grup. **** $p < 0.0001$ comparat amb els ratolins tractats amb PBS (panells inferiors).

Un funcionament defectuós en l'aclariment de cèl·lules apoptòtiques i d'ICs d'IgG, per part dels fagòcits, es considera una de les principals causes d'inflamació associada a la NL (323). De fet, en l'anàlisi de l'assaig TUNEL es va poder observar la presència de cèl·lules apoptòtiques intraglomerulars i extraglomerulars en els ronyons dels ratolins tractats amb PBS, mentre que els ratolins tractats amb C4BP(β -) i CYP no presentaven cèl·lules apoptòtiques en el còrtex renal (**Figura 38**), en correlació amb un dany renal disminuït.

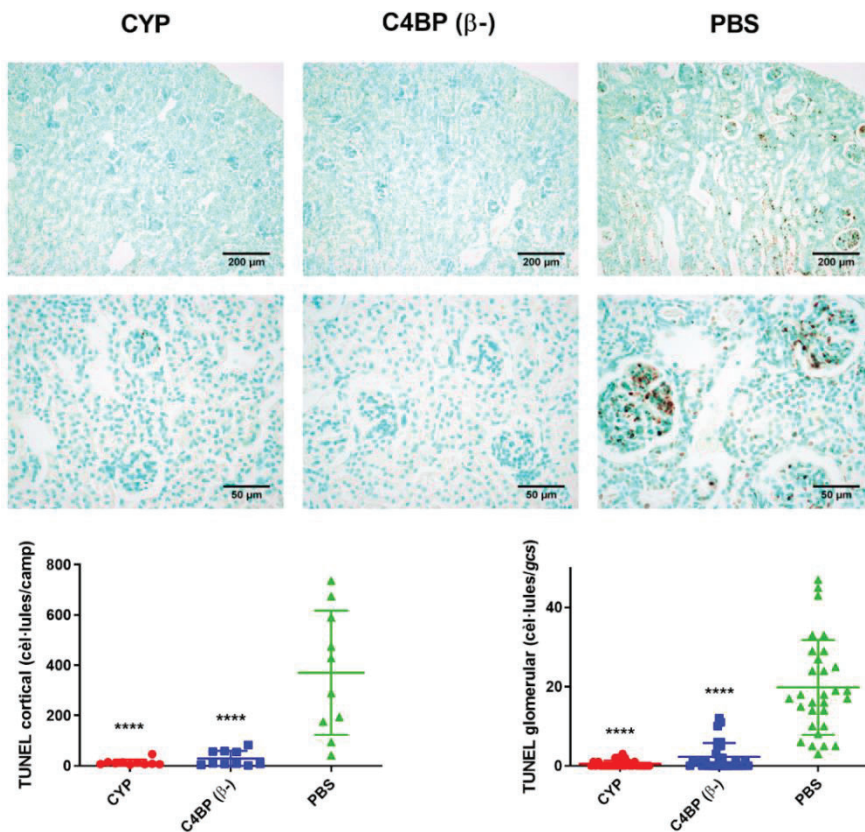


Figura 38. Avaliació del nivell d'apoptosi en el còrtex renal dels ratolins NZBW F1

El nivell d'apoptosi en el còrtex renal es va detectar per assaig TUNEL. Es mostren imatges representatives del còrtex renal dels ratolins NZBW F1 tractats amb CYP, C4BP(β -) i PBS a petit augment (escala: 200 μ m) i gran augment (escala: 50 μ m). Les cèl·lules apoptòtiques corticals es van quantificar com número de cèl·lules apoptòtiques per camp (gràfic esquerre) i les cèl·lules apoptòtiques glomerulars com número de cèl·lules apoptòtiques per secció glomerular (*glomerular cut section*; gcs) (gràfic dret). Les dades s'expressen com a mitjana \pm SD. n=3 ratolins/grup. ****p < 0.0001, comparat amb el grup tractat amb PBS.

4.1.7 El tractament amb C4BP(β -) està dirigit cap a *hallmarks* moleculars/cel·lulars característics de la NL

Per ampliar el coneixement sobre l'acció immunomoduladora local induïda pel tractament amb C4BP(β -) a nivell molecular i cel·lular, es va realitzar un anàlisi comparatiu del perfil transcripcional del teixit renal en els ratolins NZBW F1 tractats amb C4BP(β -), CYP i PBS. En l'*array* dissenyat es van incloure 377 gens involucrats en aquesta patologia (**Taula A1**, veure **Annexes**). Una avaluació preliminar dels perfils d'expressió dels ratolins tractats amb C4BP(β -) i CYP, en relació amb els ratolins control, presentava una aparença dràsticament diferent en la silueta general (**Figura 39**). D'acord amb aquest anàlisi, només 24 transcrits es trobaven diferencialment expressats ($FC \geq 1.8$) entre els ronyons dels ratolins tractats amb C4BP(β -) i PBS (**Taula A2**, veure **Annexes**). Quan es va fer el mateix anàlisi per comparar l'expressió en els ronyons dels grups tractats amb CYP i PBS, es van trobar 224 transcrits diferencialment regulats (**Taula A3**, veure **Annexes**). Tenint en compte l'eficàcia terapèutica comparable entre els tractaments amb C4BP(β -) i CYP, com es pot percebre pels paràmetres analitzats prèviament, aquests resultats van suggerir una immunomodulació més específica induïda per C4BP(β -) en comparació amb l'immunosupressor CYP en els ratolins NZBW F1 nefrítics.

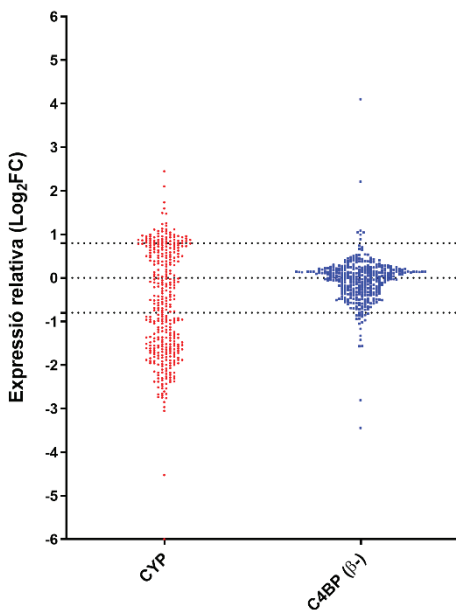


Figura 39. Comparativa del perfil transcripcional del teixit renal en el model murí de LES NZBW F1

Vista general de la comparativa dels perfils transcripcionals del teixit renal corresponent als ratolins de 36 setmanes tractats amb CYP i C4BP(β -) relativitzat per al perfil transcripcional dels ratolins nefrítics de 36 setmanes d'edat tractats amb PBS. L'RNA total va ser analitzat en un panell de 377 gens murins rellevants en la patologia de la NL. Les dades d'expressió gènica es donen com Log_2FC (FC, *fold change*). Les línies discontinuïques horitzontals indiquen un llindar de $FC \geq 1.8$ per als gens expressats, per sobre o per sota, de forma diferencial.

Un anàlisi bioinformàtic addicional basat en interaccions gèniques va revelar que les funcions biològiques rellevants modulades pel tractament amb C4BP(β -) involucraven una disminució de la migració leucocitària renal, particularment de cèl·lules mieloides, i en conseqüència una disminució de la quantitat i l'activació dels leucòcits mononuclears infiltrats, predominantment de limfòcits B (Taula 20).

Bio-funció	# gens en el dataset	overlap p-value	activation z-score*
Quantitat de leucòcits	14	2,91x10 ⁻¹¹	-2,836
Activació dels leucòcits	10	6,03x10 ⁻¹⁰	-1,455
Quantitat de leucòcits mononuclears	12	6,06x10 ⁻¹⁰	-2,541
Quantitat de limfòcits	11	6,87x10 ⁻⁹	-2,839
Migració dels leucòcits	9	8,12x10 ⁻⁷	-1,966
Activació dels limfòcits	6	5,71x10 ⁻⁶	-1,368
Quantitat de limfòcits B	6	1,41x10 ⁻⁵	-2,223
Viabilitat cel·lular dels limfòcits	4	4,15x10 ⁻⁵	-1,969
Moviment dels fagòcits	5	3,53x10 ⁻⁴	-2,211
Moviment de cèl·lules mieloides	5	3,59x10 ⁻⁴	-2,195
Infiltració cel·lular de leucòcits	4	1,90x10 ⁻³	-1,972
Inflamació dels òrgans	5	7,56x10 ⁻³	0,753

*El z-score d'activació és calculat pel *software* IPA® i prediu si una malaltia específica o una bio-funció es troba incrementada (z-score positiu) o disminuïda (z-score negatiu) segons les dades experimentals. En negreta es troben indicades les bio-funcions significatives amb un z-score > 2 o < -2.

Taula 20. Funcions biològiques rellevants associades amb l'expressió gènica diferencial a nivell renal dels ratolins NZBW F1 tractats amb C4BP(β -) (IPA®)

Adicionalment, un gran nombre de vies rellevants en immunitat, com les vies del sistema de complement, es mostraven regulades només pel tractament amb CYP (Taula A3, veure Annexes), suggerint una toxicitat incrementada del tractament amb l'immunosupressor CYP en comparació amb C4BP(β -).

Resultats

Posteriorment, es van validar els resultats esmentats, obtinguts amb les plaques de microfluídica, analitzant el teixit renal de ratolins individuals de cada grup per RT-qPCR, per als transcrits que mostraven una regulació diferencial per C4BP(β -) amb un FC ≥ 2 en l'array. Així, es va confirmar una regulació significativament disminuïda mediada per C4BP(β -) de 8 transcrits: *Irf7*, *Lat*, *Cd19*, *Ms4a1* (*Cd20*), *Tnfrsf13c* (*BAFFR*), *Prnt3*, *S100a8* i *S100a9* (Figura 40).

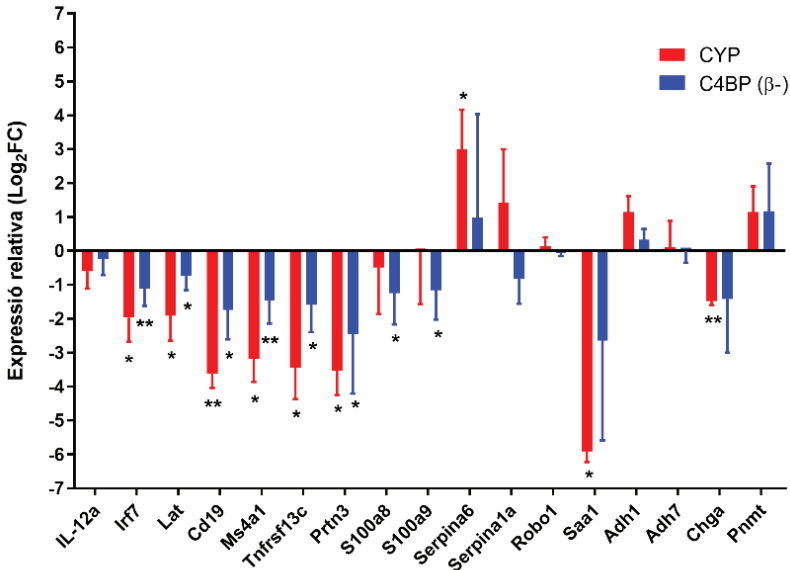


Figura 40. Validació en mostres individuals per RT-qPCR de tots els gens que van mostrar una inducció FC ≥ 2 en el perfil transcripcional corresponent al tractament amb C4BP(β -)

Les dades de l'expressió relativa per a gens específics es van obtenir a partir de l'RNA del teixit renal de ratolins individuals corresponents a cada grup de tractament. Els valors de Log₂FC s'expressen com a mitjana \pm SD. n=3-5 ratolins per grup. *p < 0.05, **p < 0.01 comparat amb els ratolins tractats amb PBS.

Tots, excepte *S100a8* i *S100a9* que codifiquen pel complex S100a8/S100a9 (calprotectina), involucrat en l'activació de l'inflamasoma i la inducció de la mielopoiesi, es trobaven també *downregulats* pel tractament amb CYP. Sorprenentment, excepte *Irf7*, que codifica per un factor de transcripció clau involucrat en la via dels IFN de tipus I activada pels sensors innats com TLR7, com a conseqüència d'una maduració lisosomal alterada dels fagòcits en el LES (155), tots els altres transcrits són marcadors cel·lulars específics de limfòcits T activats (*Lat*), limfòcits B (*Cd19*, *Ms4a1* i *Tnfrsf13c*), i neutròfils (*Prnt3*, *S100a8* i *S100a9*). Això és indicatiu d'una infiltració limfocitària

significativa, suggerint una pèrdua de la tolerància immunitària com a causa subjacent de la NL en els ronyons dels ratolins NZBW F1 tractats amb PBS, que, per contra, resultava mitigada pels tractaments amb C4BP(β -) i CYP. A més, una valoració de la xarxa de comunicació entre el conjunt gènic regulat per C4BP(β -) on s'inclouen els 8 gens significativament regulats abans esmentats, amb les vies KEGG, utilitzant el programa PathwAX (<http://pathwax.sbc.su.se/>) va reflectir una depleció significativa (*false discovery rate* ≤ 0.5) de cèl·lules immunitàries hematopoètiques i, particularment, de les vies de senyalització de cèl·lules B i la via pro-inflamatòria d'NF- κ B en el teixit renal del ratolins tractats amb C4BP(β -) en comparació amb el teixit renal nefrític dels ratolins tractats amb PBS (Taula 21).

Tipus de via	Ordre numèric ^a	Via rellevant	FWER	Connectivitat a la xarxa dels gens induïts per C4BP(β -) (<i>links</i>)								
				<i>Ms4a1</i>	<i>Prtn3</i>	<i>Tnfrsf13c</i>	<i>Lat</i>	<i>Cd19</i>	<i>S100a8</i>	<i>S100a9</i>	<i>Irf7</i>	
Malalties humanes	14	Lupus eritematosès sistèmic	2.20x10 ⁻³	5 ^b	1 ^b	0	0	0	0	0	0	1 ^b
	2	Llinatge cel·lular hematopoètic	1.53x10 ⁻¹⁴	4 ^c	0	1 ^b	4 ^b	4 ^c	0	0	0	0
Sistemes orgànics	3	Via de senyalització del receptor de cèl·lules B	1.68x10 ⁻¹²	3 ^b	0	2 ^b	3 ^b	0	0	0	0	1 ^b
	15	Processament i presentació d'antigens	2.46x10 ⁻³	5 ^b	1 ^b	0	1 ^b	0	0	0	0	0
	18	Via de senyalització del receptor de cèl·lules T	6.01x10 ⁻³	1 ^b	0	0	7 ^c	0	0	0	0	0
Ambient informació processament	4	Via de senyalització d'NF- κ B	2.27x10 ⁻⁹	3 ^b	0	0	5 ^c	2 ^b	0	1 ^b	1 ^b	0
	6	Molècules d'adhesió cel·lular	2.44x10 ⁻⁶	7 ^b	0	0	2 ^b	1 ^b	0	0	0	0
	12	Interacció citocina-receptor de citocina	9.62x10 ⁻⁴	4 ^b	0	0	0	2 ^b	0	0	0	1 ^b

0-7, grau de connectivitat; FWER, *family-wise error rate*

^aEls resultats estan ordenats per FWER creixent

^bGens consultats vinculats a la via

^cGens que formen part de la via

Taula 21. Vies biològiques involucrades en l'expressió gènica renal *downregulades* pel tractament amb C4BP(β -) en el model NZBW F1 (PathwAX)

4.1.8 C4BP(β -) modula el patró d'expressió de citocines en el model murí NZBW F1

Per completar els resultats del perfil transcripcional obtingut, es va examinar la presència de citocines inflammatòries en el sèrum dels ratolins NZBW F1 obtingut al final de l'estudi. Així, es va realitzar una *array* de citocines que incloïa 40 citocines, quimiocines i proteïnes de fase aguda murines, on es va veure que la quimiocina CXCL13 era l'única diferencialment abundant, present en els ratolins tractats amb PBS però absent en els tractats amb C4BP(β -) o CYP (**Figura 41**). Aquesta quimiocina atraient de cèl·lules B, produïda per macròfags i DCs, és molt rellevant en la patologia renal que caracteritza el LES.

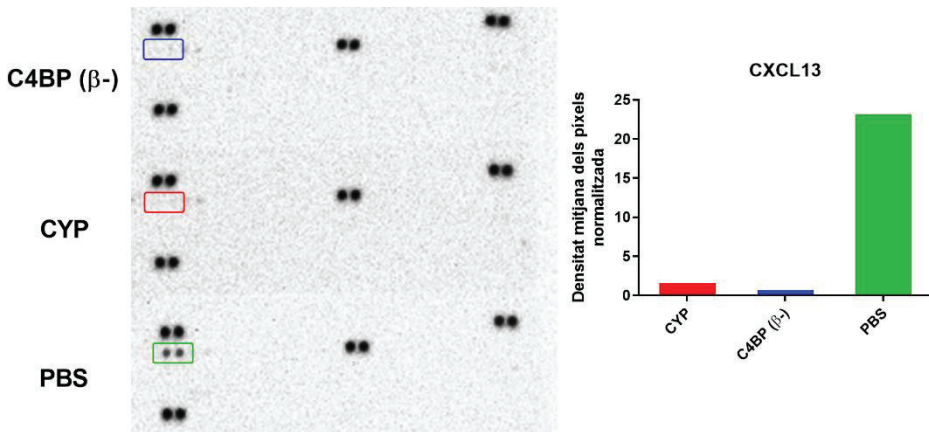


Figura 41. Perfil de citocines circulants en el model murí de LES NZBW F1

Els sèrums van ser incubats amb el *Proteome Profiler Mouse Cytokine Array* (R&D Systems) d'acord amb les instruccions del fabricant. La densitat de cada punt va ser quantificada mitjançant el software *Quantity One* (Bio-Rad) i va ser presentada com a densitat mitjana dels pixels, normalitzada amb els punts de referència, pel lligand 13 de quimiocines de tipus CXC (CXCL13) en cada grup de tractament. Pools de dos ratolins per grup.

Aquest mateix anàlisi es va realitzar en teixit renal, confirmant l'expressió diferencial de la quimiocina CXCL13 i, addicionalment, revelant la modulació del component C5/C5a del complement i dels membres de la família d'IL-1, el receptor antagonista d'IL-1 (IL-1ra) i d'IL-1 β (**Figura 42**). Així, l'increment local d'aquests factors inflamatoris, presents en els ronyons dels ratolins control, es va prevenir amb el tractament amb C4BP(β -) y CYP.

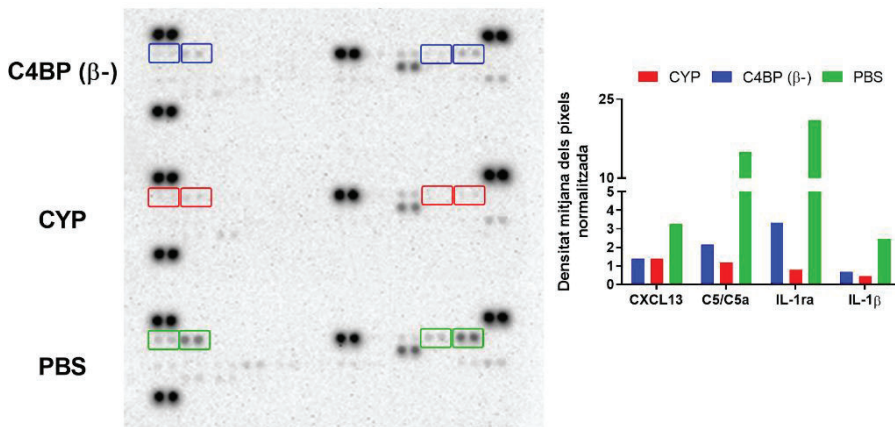


Figura 42. Perfil de citocines en teixit renal en el model murí de LES NZBW F1

Les mostres de proteïna total resultant de l'extracció del teixit renal de cada grup de tractament van ser incubades amb el *Proteome Profiler Mouse Cytokine Array* (R&D Systems) d'acord amb les instruccions del fabricant. La densitat de cada punt va ser quantificada mitjançant el software *Quantity One* (Bio-Rad) i va ser presentada com a densitat mitjana dels píxels normalitzada amb els punts de referència, per cada citocina rellevant i tractament. Pools de dos ratolins per grup. CXCL13: lligand 13 de quimiocines de tipus CXC; C5: component 5 del complement; IL-1ra: receptor antagonista de la interleucina-1; IL-1β: interleucina-1β.

Posteriorment, es van confirmar els resultats obtinguts en l'*array* avaluant els nivells de CXCL13 en mostres de sèrum (Figura 43A) i teixit renal (Figura 43B) dels ratolins, en mostres individuals, amb un assaig d'ELISA específic.

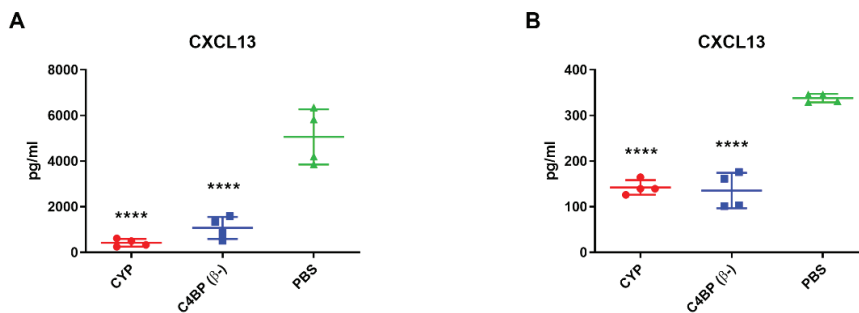


Figura 43. Nivells de quimiocina CXCL13 circulants i en teixit renal

Es va fer una validació addicional de la quimiocina CXCL13 en mostres de ratolí individuals mitjançant un ELISA específic en sèrum (A) i en teixit renal (B). Les dades s'expressen com a mitjana ± SD. n=4 ratolins per grup, realitzat per duplicat. ****p < 0.0001 comparat amb el tractament amb PBS.

4.1.9 El tractament amb C4BP(β -) evita la infiltració leucocitària i el desenvolupament d'ELS en el parènquima renal dels ratolins NZBW F1

La NL és una condició inflamatòria crònica que presenta una infiltració leucocitària significativa durant el transcurs de la malaltia, com es suggereix per les dades mostrades en el perfil transcripcional. En efecte, l'avaluació immunohistoquímica de marcadors de leucòcits inflamatoris en el còrtex renal dels ratolins NZBW F1 de 36 setmanes d'edat tractats amb PBS va evidenciar una tinció positiva, generalment perivascular i ocasionalment periglomerular, no només de cèl·lules T (Lat) i cèl·lules B (CD19) activades, sinó també de diferents poblacions de cèl·lules de la línia mieloide: neutròfils (Gr1), DCs (CD11c) i monòcits/macròfags intersticials (F4/80). Per contra, aquests marcadors es van presentar en menor grau o es mostraven absents en els ratolins tractats amb C4BP(β -) i CYP (**Figura 44**).

La quimiocina CXCL13 juga un paper clau en el reclutament i l'organització d'agregats nodulars de cèl·lules B, cèl·lules T activades i DCs al voltant de vasos limfàtics formats *de novo*, que conformen les ELS. Així, també es va confirmar la presència de múltiples ELS en el còrtex renal del ratolins nefrítics, tractats amb PBS, per tinció d'hematoxilina i eosina, i immunohistoquímica per a cèl·lules T (Lat) i cèl·lules B (CD19) (**Figura 45**). Contràriament, l'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) va prevenir el desenvolupament local d'ELS en aquests ratolins, en correlació amb la reducció de la formació d'autoanticossos i la millora de la funció renal.

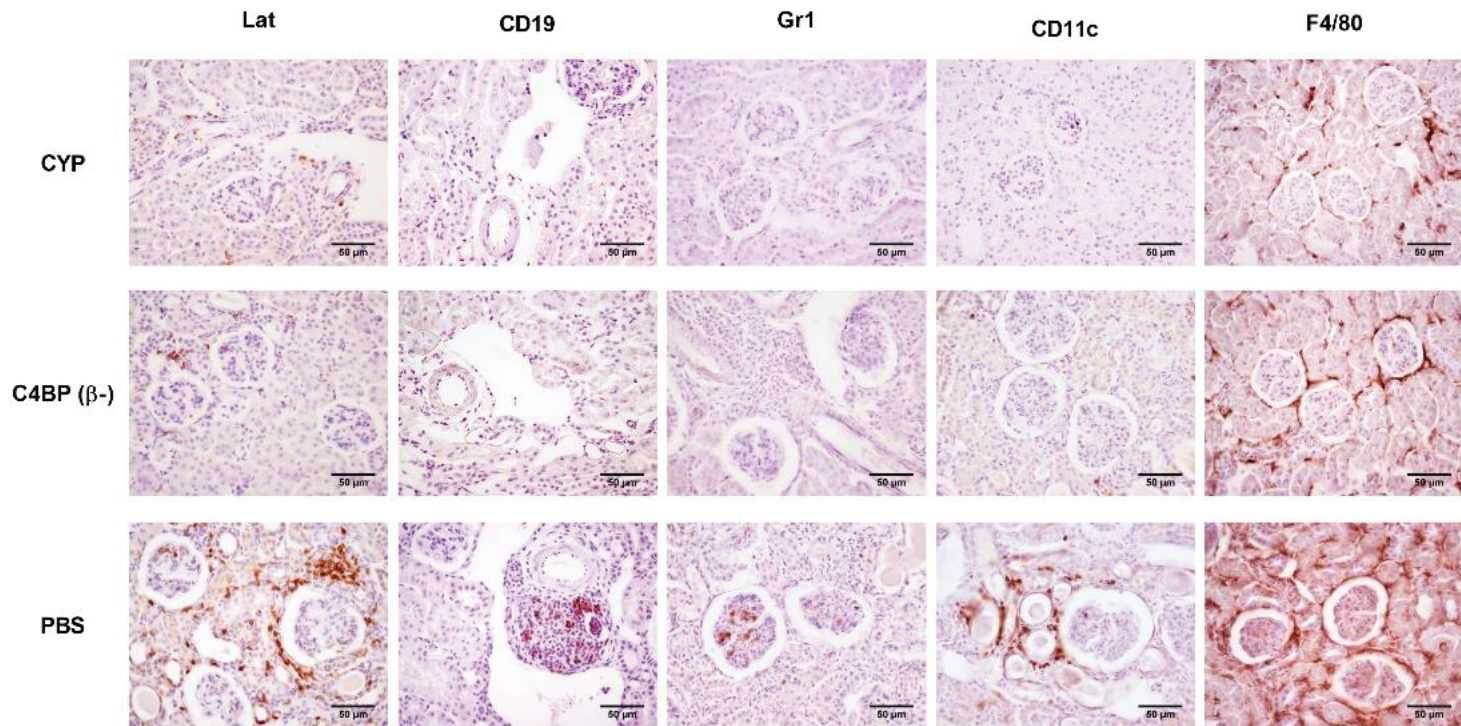


Figura 44. Immunohistoquímica del còrtex renal dels ratolins NZBW F1

Avaluació dels infiltrats de cèl·lules immunitàries en les seccions de còrtex renal de ratolins NZBW F1 de 36 setmanes d'edat tractats amb CYP, C4BP(β-) i PBS (escala: 50 μm). En les seccions renals del ratolins tractats amb PBS es va observar tinció local intensa perivascular, periglomerular i/o glomerular per cèl·lules T activades (Lat), cèl·lules B (CD19) i cèl·lules mieloides com neutròfils (Gr1), DCs (CD11c) i monòcits/macròfags (F4/80), aquest últim amb una tinció forta i difusa al voltant dels glomèruls (panells inferiors). Contràriament, les seccions renals del ratolins tractats amb CYP (panells superiors) i amb C4BP(β-) (panells del mig) presentaven una tinció lleu per als marcadors inflamatoris referits. Els resultats de cada fila són representatius de la tinció realitzada sobre els teixits de tres animals de cada grup.

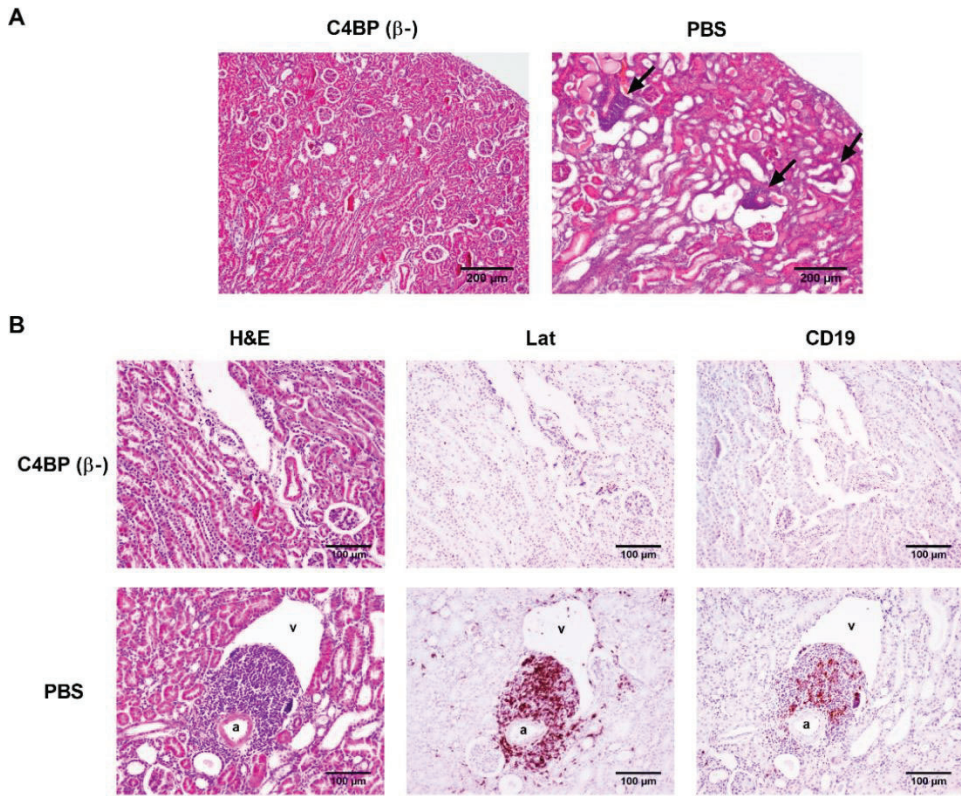


Figura 45. C4BP(β-) evita el desenvolupament d'ELS en el model de LES NZBW F1

(A) En els panells superiors es mostren seccions de còrtex renal representatives de ratolins de 36 setmanes d'edat tractats amb C4BP(β-) (esquerra) o PBS (dreta) amb tinció d'hematoxilina i eosina. La formació d'ELS és clarament visible (fletxes negres) en el ratolí tractat amb PBS i és absent en el ratolí tractat amb C4BP(β-) (escala: 200 μm). Imatges representatives de 4 ratolins de cada grup. (B) En els panells inferiors es mostren seccions renals consecutives de ratolins tractats amb C4BP(β-) i amb PBS amb tinció d'hematoxilina i eosina (esquerra), immunotinció amb Lat (marcador de cèl·lules T activades) (centre) i CD19 (marcador de cèl·lules B) (dreta). Es pot observar co-localització de cèl·lules T i B en una ELS formada al voltant d'una arteriola (a) i al costat d'una vena (v) en les imatges a gran augment de còrtex renal del ratolí tractat amb PBS. En els còrtex renals dels ratolins tractats amb C4BP(β-) no es va observar la formació d'ELS (escala: 100 μm).

4.1.10 L'activitat inhibidora del complement de C4BP no té efecte sobre la patologia de la NL en els ratolins NZBW F1

Per avaluar si la inhibició del complement exercida per C4BP podia ser responsable de la millora de la malaltia, es va realitzar un estudi comparatiu (**Figura 23** en la secció **3.1.5** en **Metodologia**), administrant la mateixa dosi de la isoforma minoritària, C4BP(β^-), que presenta ambdues activitats, inhibició del complement i activitat immunomoduladora, o la isoforma majoritària, C4BP(β^+), que presenta l'activitat inhibidora del complement però no l'activitat immunomoduladora, en el model NZBW F1.

Els ratolins tractats amb C4BP(β^-) mostraven uns nivells de proteïnúria reduïts, disminució d'anticossos anti-dsDNA i dels nivells de BUN, presentaven una histologia renal més preservada amb una mínima infiltració de cèl·lules immunitàries, i una taxa de supervivència incrementada en comparació amb els ratolins tractats amb C4BP(β^+) (**Figura 46**).

A més, es va analitzar l'activitat de la via clàssica del complement en sèrum fresc obtingut dels ratolins NZBW F1 de forma prèvia a l'inici de l'estudi (setmana 21) i a diferents punts durant el tractament amb C4BP (setmanes 25, 29 i 33). L'activitat del complement es trobava gairebé dins del rang normal en els ratolins joves, abans de començar el tractament amb C4BP, però es mostrava reduïda a mesura que progressava la patologia tant en els ratolins tractats amb PBS com en els ratolins tractats amb C4BP(β^+) (**Figura 47**). També es va reportar una caiguda severa de l'activitat hemolítica del complement prèvia a l'aparició de les característiques clíniques de la patologia renal en aquests ratolins, suggerint l'esgotament del complement degut a la formació dels ICs. Per contra, el tractament amb C4BP(β^-) va prevenir significativament la hipocomplementèmia en les etapes inicials de tractament. No obstant, l'esgotament del complement no es va poder prevenir en les etapes posteriors de tractament, possiblement degut a la pèrdua d'eficàcia del tractament immunomodulador com a conseqüència del desenvolupament de la xeno resposta immunitària anti-C4BP(β^-) humana, com s'ha indicat prèviament.

Resultats

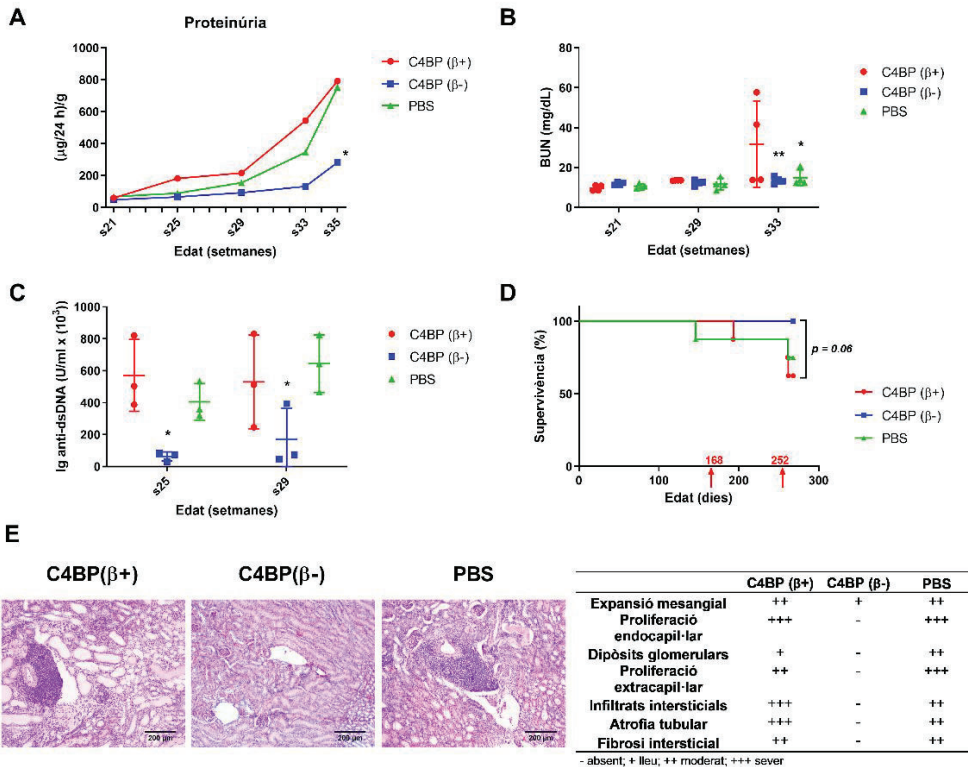


Figura 46. Determinació patològica comparativa de la NL en els ratolins NZBW F1 després de l'administració de les dues isoformes de C4BP: C4BP(β+) i C4BP(β-)

(A) Els nivells de proteinúria es van monitoritzar mensualment al llarg de tot l'experiment des de la setmana 21 fins la setmana 35. Els nivells de proteïna total en orina de 24 hores es va determinar per assaig d'unió de proteïnes pel mètode del vermell de pirogal·lol i molibdat. Les dades estan normalitzades pel pes corporal de cada ratolí i s'expressen com a valors acumulats mitjans. n=8 ratolins/grup. *p < 0.05 comparat amb C4BP(β+) i PBS. (B) Els nivells de BUN es van avaluar abans (setmana 21) i durant (setmanes 29 i 33) el tractament. Les dades s'expressen com a mitjana ± SD. n=4 ratolins/grup. *p < 0.05, **p < 0.01, comparat amb els ratolins tractats amb C4BP(β+) (s33). (C) Els nivells sèrics d'anticossos anti-dsDNA es van mesurar per ELISA després de l'inici del tractament (setmanes 25 i 29). Les dades s'expressen com a mitjana ± SD. n=3 ratolins/grup. *p < 0.05 comparat amb els ratolins tractats amb C4BP(β+) (s25), *p < 0.05 comparat amb el grup PBS (s29). (D) Corbes de supervivència de Kaplan-Meier en el model murí de LES NZBW F1. La corba de supervivència acumulada mostra un 100% de supervivència (8/8) en el grup tractat amb C4BP(β-), un 75% de supervivència (6/8) en el grup tractat amb PBS i un 62.5% de supervivència (5/8) en el grup tractat amb C4BP(β+) al final de l'estudi (dia 252). Les fletxes vermelles indiquen l'inici (dia 168) i el final (dia 252) del període de tractament. n=8 ratolins/grup. *p < 0.06, comparat amb C4BP(β+); test log-rank. (E) Seccions representatives de còrtex renal dels ratolins de 36 setmanes d'edat tractats amb C4BP(β+) (esquerra), C4BP(β-) (al mig) i PBS (dreta) amb tinció d'hematoxilina i eosina. Les mostres obtingudes es van utilitzar per avaluar semi-quantitativament els trets histopatològics indicatius de NL activa (expansió mesangial, proliferació endocapil·lar, dipòsits glomerulars, proliferació extracapil·lar i infiltrats intersticials) així com les lesions cròniques (atrofia tubular i fibrosi intersticial). Es mostra una imatge representativa de tres ratolins de cada grup.

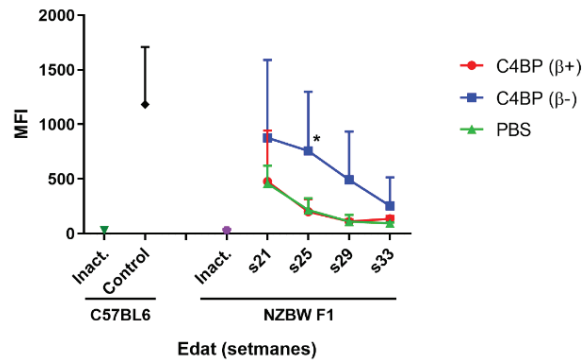


Figura 47. Efecte del tractament amb C4BP(β+) i C4BP(β-) en l'activitat de la via clàssica del complement en el sèrum dels ratolins NZBW F1

L'activitat de la via clàssica del complement es va mesurar com acumulació de C3b en cèl·lules K562 opsonitzades amb anticossos i incubades amb sèrum murí durant 30 minuts a 37°C. C3b dipositada va ser detectada utilitzant un anticòs conjugat amb FITC i citometria de flux. MFI, intensitat mediana de fluorescència. Els nivells de l'activitat del complement en els ratolins NZBW F1 es van analitzar abans de començar el tractament amb C4BP (setmana 21, n=6 ratolins per grup) i durant el tractament (setmana 25, n=6 ratolins per grup; 29 i 33, n=3 ratolins per grup). Les dades s'expressen com la mitjana ± SD. *p < 0.05 comparat amb el tractament amb C4BP(β+) i PBS. El sèrum de ratolins C57BL/6 (14 setmanes d'edat, n=4) es va incloure com a control de referència per a l'activitat normal del complement. Els controls negatius (Inact) de totes les mostres analitzades es van determinar després d'inactivar el sèrum a 56°C durant 30 minuts.

4.1.11 Eficàcia terapèutica de C4BP(β-) en el model murí de LES MRL-lpr

Els resultats esmentats anteriorment i l'eficàcia terapèutica de la immunomodulació exercida per C4BP(β-) es van validar en el model murí MRL-lpr, un model alternatiu de LES i NL espontània (Figura 24 en la secció 3.1.5 en Metodologia). Així, el tractament setmanal amb 100 µg de C4BP(β-) per ratolí, iniciat a les 10 setmanes d'edat, no només va mitigar el desenvolupament de proteïnúria, incrementar la supervivència, preservar la histologia renal i prevenir la formació de teixit limfoide ectòpic si no que també va millorar el desenvolupament de dermatitis i vasculitis, trets característics del LES en aquest model (Figura 48).

Resultats

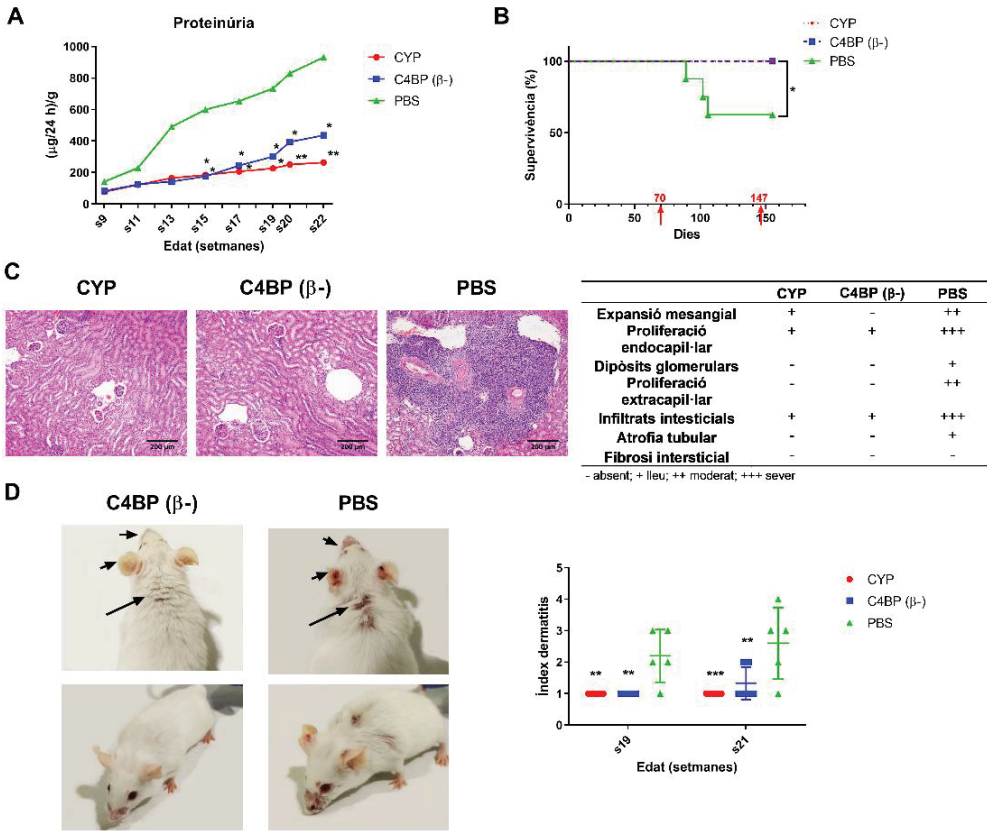


Figura 48. C4BP(β-) atenua les manifestacions clíniques característiques del LES en el model murí MRL-lpr

(A) Els nivells de proteinúria es van monitoritzar bimensualment (excepte quan s'especifica) al llarg de tot l'assaig des de la setmana 9 (s9) fins la setmana 22 (s22). Els nivells de proteïna total en orina de 24 hores es van determinar per assaig d'unió de proteïnes pel mètode del vermell de pirogal·lol i molibdat. Les dades estan normalitzades pel pes corporal i s'expressen com a mitjana acumulada. PBS, n=8; C4BP(β-) i CYP, n=6. *p < 0.05, **p < 0.01 comparat amb el grup control tractat amb PBS. (B) Corbes de supervivència de Kaplan-Meier del model murí de LES MRL-lpr. La corba de supervivència acumulada mostra un 100% de supervivència en els grups tractats amb CYP i C4BP(β-) (8 de 8) i un 62.5% de supervivència en el grup control (5 de 8) al final de l'estudi (dia 147). Les fletxes vermelles indiquen l'inici (dia 70) i el final (dia 147) del període de tractament. n=6-8 ratolins/grup. *p < 0.05 comparat amb el grup control tractat amb PBS; test log-rank. (C) Seccions representatives del còrtex renal dels ratolins de 22 setmanes d'edat amb tinció d'hematoxilina i eosina. Les mostres obtingudes es van utilitzar per avaluar els trets histopatològics indicatius de NL activa semi-quantitativament (expansió mesangial, proliferació endocapil·lar, dipòsits glomerulars, proliferació extracapil·lar i infiltrats intersticials), així com les lesions cròniques (atrofia tubular i fibrosi intersticial). n=3 ratolins/grup. (D) Característiques clíniques de dermatitis en els ratolins MRL-lpr tractats amb C4BP(β-) (panell esquerre) o amb PBS (panell dret). Els ratolins control mostraven lesions generals al voltant de la regió facial i escapular, i vasculitis en les orelles. A la dreta es mostra la puntuació corresponent a la severitat de les lesions dermatològiques en la setmana 19 i 21 per cada grup d'estudi. PBS, n=5; C4BP(β-) i CYP, n=6. **p < 0.01, ***p < 0.001 en comparació amb el grup control tractat amb PBS.

4.2 L'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) limita el desenvolupament de la CU

4.2.1 C4BP(β -) millora els trets patològics i disminueix l'activitat de la malaltia en el model murí de CU aguda induïda per DSS

Per avaluar la capacitat de C4BP(β -) en la inhibició de la inflamació induïda pel DSS i els efectes associats en els ratolins C57BL/6, com a model establert de CU, es va dissenyar una pauta d'administració de C4BP(β -) per via subcutània a dies 4, 6 i 8 (en base als assajos realitzats prèviament) després de l'inici de la inducció de la malaltia (dia 0) (**Figura 25** en la secció 3.2.2 en **Metodologia**). Per avaluar comparativament la seva eficàcia, els ratolins van ser tractats diàriament amb l'antibiòtic minociclina com a control de tractament (324,325).

L'administració de DSS a una concentració del 2% (p/v) durant els 5 primers dies va provocar la inducció d'un estat inflamatori en el colon prèviament descrit (296,312). El procés inflamatori a nivell del colon es va associar amb una disminució del pes corporal dels ratolins en comparació amb els ratolins sans (blanc) clarament observable des del dia 6 posterior a l'inici de l'experiment. Aquestes diferències incipients entre els dies 5 i 6 es van incrementar progressivament durant el transcurs de l'estudi en correlació amb la severitat de la inflamació i la progressió de la malaltia. Els animals amb CU induïda tractats amb C4BP(β -) van presentar una menor pèrdua de pes, estadísticament significativa i similar a la del grup tractat amb minociclina, respecte a la pèrdua de pes del grup DSS (**Figura 49**).

Resultats

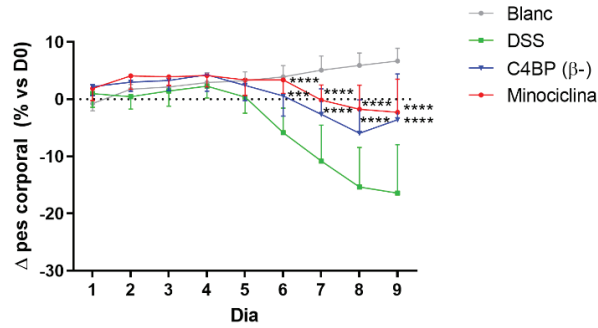


Figura 49. Variació del pes corporal en el model murí de CU induïda per DSS

Efecte de l'administració de C4BP(β-) (50 µg, via subcutània) i minociclina (50 mg/kg, via oral) en l'evolució del pes corporal en els ratolins del model de CU induïda per DSS, representat com variació (Δ) del pes corporal (percentatge de pes corporal perdut o guanyat respecte dia 0). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD. Blanc i C4BP(β-), n=8; DSS, n=12; minociclina, n=10. ***p < 0.001, ****p < 0.0001 comparat amb DSS. L'estadística del grup blanc vs. DSS no s'inclou en el gràfic, ****p < 0.0001 a partir de dia 6.

La variació de pes global de cada animal es va calcular amb el pes de dia 9 respecte el pes a l'inici de l'estudi en forma de percentatge. En aquest cas, també es va evidenciar una reducció estadísticament significativa del percentatge de pèrdua de pes corporal en el grup tractat amb C4BP(β-) respecte al grup DSS. A més, no es van observar diferències estadísticament significatives entre el grup tractat amb C4BP(β-) i el grup tractat amb minociclina (Taula 22). Al llarg de tot l'estudi no va morir cap animal.

Trets patològics

Grup experimental	Índex de l'activitat de la malaltia (DAI)		Δ pes corporal
	AUC (d0-d9)	%INH vs. DSS	% (d9 vs. d0)
Blanc	0.0 ± 0.0	-	6.7 ± 0.8
DSS	9.7 ± 1.2	-	-16.4 ± 2.4
C4BP(β-)	4.4 ± 1.1***	54.1 ± 11.5	-3.6 ± 2.8***
Minociclina	3.1 ± 0.5****	67.9 ± 4.9	-2.3 ± 1.8***

Les dades corresponen a la mitjana ± SD. (***p < 0.001, ****p < 0.0001 en comparació amb el grup DSS).

AUC: àrea sota la corba; %INH: percentatge d'inhibició de la malaltia; Δ: variació

Taula 22. Valors obtinguts a partir del DAI i de la variació del pes corporal en els grups d'estudi del model de CU experimental induïda per DSS

Durant el temps d'estudi, a més del pes corporal dels animals, es van avaluar també altres paràmetres fenotípics com la presència de diarrea i de sang en els excrements de cada ratolí i les dades es van utilitzar per calcular el DAI, segons els criteris establerts (veure **taula 16** a l'apartat **3.2.2 en Metodologia**). Per poder realitzar una comparació global de les dades del DAI, es va calcular l'AUC, obtenint un valor que era representatiu de la puntuació DAI al llarg de tot l'estudi. Així, en concordança amb la pèrdua de pes, els valors del DAI també es van incrementar progressivament en el grup DSS al llarg de l'estudi. L'administració de C4BP(β -) a dies 4, 6 i 8 va donar lloc a una resposta inflamatòria significativament atenuada, en comparació amb el grup DSS, mostrant una disminució dels valors del DAI, associada a una reducció de la pèrdua de pes corporal i també a una major consistència dels excrements en absència de sang visible, de forma similar al grup tractat amb minociclina. Consistentment, el valor de l'AUC del DAI es va reduir en els grups de tractament de forma significativa respecte el grup amb CU induïda per DSS (**Figura 50**). Tot i que l'administració terapèutica de C4BP(β -) no va aturar la progressió de la malaltia, ja que els valors de DAI es van anar incrementant al llarg de l'estudi, es va evidenciar un clar efecte anti-inflamatori del tractament a nivell intestinal, mostrant capacitat per reduir la severitat de la malaltia.

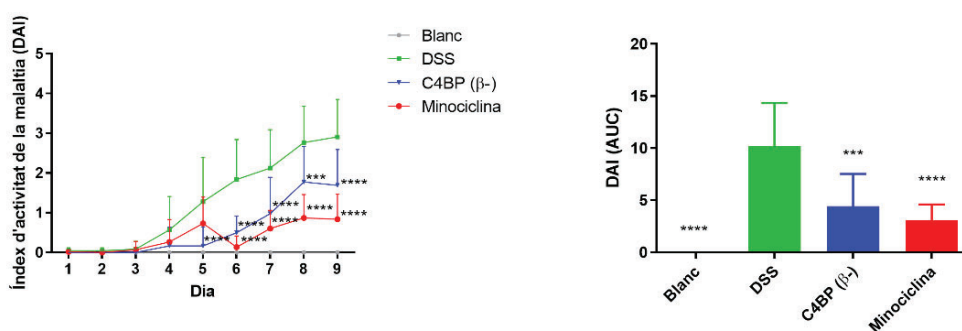


Figura 50. C4BP(β -) disminueix el DAI en els ratolins amb CU induïda per DSS

El gràfic de l'esquerra representa els valors de l'índex d'activitat de la malaltia (DAI) durant els 9 dies de procediment experimental segons els criteris proposats a la **taula 16** (veure apartat **3.2.2 en Metodologia**). A la dreta es mostra l'àrea sota la corba (AUC) calculada amb els valors del DAI per cada grup. El resultat s'expressen com la mitjana \pm SD. Blanc i C4BP(β -), n=8; DSS, n=12; minociclina, n=10. ***p < 0.001, ****p < 0.0001 en comparació amb el grup DSS.

Addicionalment, els valors del DAI de cada animal individual sotmès a tractament es van utilitzar per calcular el percentatge d'inhibició de la malaltia respecte el grup DSS. El tractament amb C4BP(β -) va mostrar una inhibició estadísticament significativa d'un 54.1% i la minociclina va inhibir la malaltia en un 67.9% (**Taula 22**).

Així, el tractament amb C4BP(β -) va mitigar el desenvolupament dels trets patològics característics de la CU avaluats: la pèrdua de pes i la pèrdua de consistència i presència de sang en els excrements.

4.2.2 C4BP(β -) millora l'estat inflamatori macroscòpic del colon

Una vegada sacrificats els animals, després de 9 dies d'experiment, el colon es va pesar, es va mesurar la seva llargada i també es va puntuar macroscòpicament el dany visible, segons la consistència dels excrements, la presència de sang i la inflamació, en una escala del 0 al 3 d'acord amb la **taula 17** (veure apartat **3.2.2** en **Metodologia**). Tenint en compte aquests paràmetres es va avaluar l'estat inflamatori del colon induït per l'administració de DSS.

L'examinació macroscòpica de les mostres de colon del grup DSS va revelar l'absència d'excrements sòlids, un increment del gruix de la paret del colon i edema a nivell de la mucosa. Aquest estat inflamatori es va evidenciar amb l'augment de la *ratio* pes del colon (normalitzada pel pes corporal)/llargada del colon, respecte el grup blanc. El grup C4BP(β -) va mostrar un efecte anti-inflamatori efectiu. D'acord amb els trets patològics prèviament avaluats, l'aparença dels colons d'aquest grup mostrava una tendència a la normalitat. 6 de 8 ratolins presentaven excrements sòlids, una absència de sagnat visible i un engruïment de la paret intestinal reduït en comparació amb l'observat en el grup DSS, confirmant una reducció de la severitat de la malaltia. Així, la puntuació macroscòpica obtinguda en el grup de tractament amb C4BP(β -) va assolir valors significativament inferiors. D'igual manera, el tractament va disminuir la *ratio* pes/llargada del colon assolint la significació estadística (**Figura 51**). El tractament amb minociclina oral també va mostrar un efecte anti-inflamatori a nivell intestinal evidenciat macroscòpicament per una reducció significativa de la puntuació associada

al dany en el colon en comparació amb el grup DSS i una reducció de la *ratio* pes/llargada del colon.

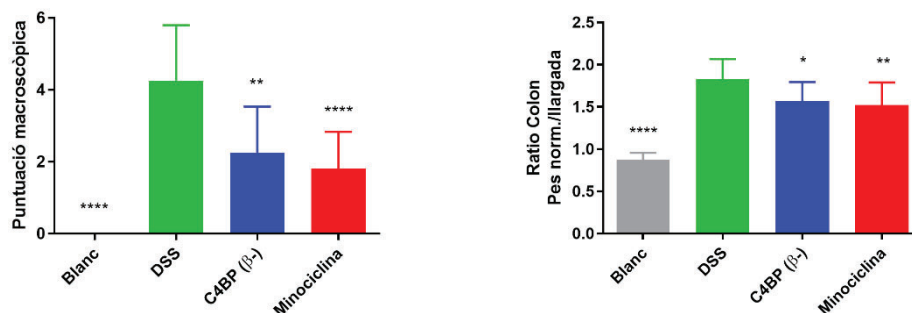


Figura 51. Efecte de C4BP(β-) sobre els paràmetres macroscòpics intestinals en el model de CU induïda per DSS

A l'esquerra, valors de la puntuació macroscòpica dels diferents grups experimentals en el model de CU induïda per DSS segons la valoració establerta a la **taula 17** (veure apartat **3.2.2** en **Metodologia**). C4BP(β-) va ser administrada subcutàniament a dies 4, 6 i 8. El grup blanc (sense colitis) i el grup DSS van ser injectats amb PBS a dia 0. La minociclina va ser utilitzada com a tractament de referència i va ser administrada diàriament (dia 0-9) per via oral. Un cop que els ratolins van ser sacrificats, es van obtenir les mostres de colon que es van pesar i mesurar, i van ser analitzades macroscòpicament. A la dreta es mostra la *ratio* del pes del colon normalitzada/llargada del colon, que es va calcular normalitzant el pes del colon amb el pes de cada animal i dividint el valor per la llargada del colon. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD. Blanc i C4BP(β-), n=8; DSS, n=12; minociclina, n=10. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 comparat amb el grup DSS.

4.2.3 C4BP(β-) preserva histològicament l'estructura del colon distal

La severitat de la inflamació intestinal també va ser analitzada utilitzant tinció d'hematoxilina i eosina. Com s'esperava, en el grup de ratolins amb CU induïda per DSS que no van rebre tractament, les seccions transversals de teixit intestinal van mostrar dany a nivell histològic: disrupció de l'estructura de les criptes amb un espai incrementat entre elles, disminució de la quantitat de cèl·lules de Goblet i infiltració cel·lular inflamatòria en la mucosa.

Resultats

Per contra, les mostres dels animals tractats amb C4BP(β -) i minociclina mostraven una arquitectura intestinal equiparable a la dels ratolins del grup blanc (**Figura 52**).

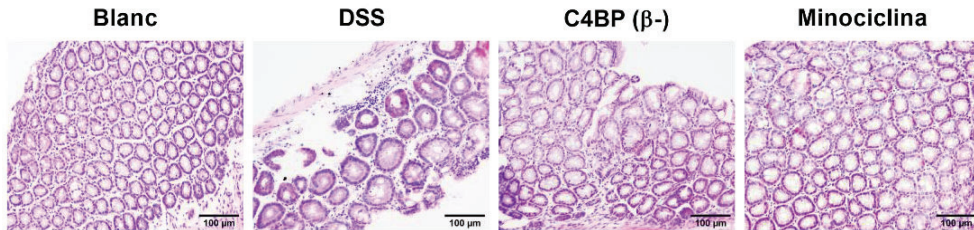


Figura 52. Avaluació histopatològica del colon distal en el model murí de CU induïda per DSS

Es mostren seccions transversals del colon distal amb tinció d'hematoxilina i eosina, representatives dels ratolins de cada grup indicat després de 9 dies d'experiment. En el grup DSS es mostren característiques histopatològiques de la CU com pèrdua de l'arquitectura de les criptes intestinals, pèrdua de cèl·lules de Goblet i infiltració de cèl·lules inflamatòries (escala: 100 μ m).

4.2.4 C4BP(β -) preserva la integritat de les unions estretes en l'epiteli intestinal

En condicions homeostàtiques, les cèl·lules de l'epiteli intestinal que revesteixen la superfície mucosa es troben unides entre elles mitjançant les unions estretes, formant una monocapa continua i polaritzada. Aquestes unions estretes consisteixen en un conjunt de proteïnes transmembrana (claudines i ocludines) i proteïnes accessòries (*zonula occludens* (ZO-1)) localitzades en la part més apical de la membrana lateral de les cèl·lules epitelials i segellen l'espai paracel·lular entre les cèl·lules adjacents per prevenir la propagació de patògens i antígens nocius a través de l'epiteli, jugant un rol fonamental en el manteniment de la funcionalitat de la barrera intestinal. L'exposició a bacteris patogènics o a substàncies tòxiques, com el DSS, produeix una disfunció de la barrera intestinal caracteritzada per una expressió alterada d'aquestes proteïnes.

Amb l'objectiu de comprovar si C4BP(β -) exercia un efecte en la preservació de la integritat de barrera intestinal en el model murí de CU induïda per DSS, es va analitzar l'expressió de les proteïnes de les unions estretes en el teixit intestinal. L'anàlisi per Western Blot va mostrar una expressió absent (claudina-1, ZO-1) o disminuïda (occludina) d'aquestes proteïnes en el teixit intestinal dels ratolins del grup DSS. En comparació amb aquest grup, el tractament amb C4BP(β -) va preservar la seva expressió (Figura 53).

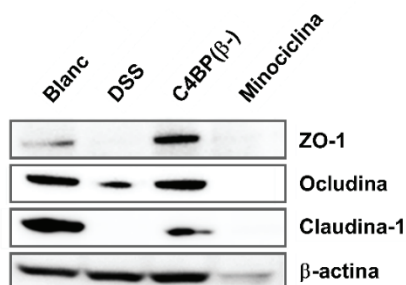


Figura 53. Expressió de les proteïnes de les unions estretes analitzada per Western Blot

30 ng de proteïna total extreta de teixit intestinal es van analitzar per SDS-PAGE i Western Blot amb anticossos per a la detecció de les proteïnes de les unions estretes: claudina-1 (22 kDa), occludina (60-82 kDa) i ZO-1 (220 kDa). Per normalitzar la quantitat de proteïna es va fer servir β -actina (42 kDa). Es mostra representat un animal de cada grup.

4.2.5 C4BP(β -) disminueix els nivells d'endotoxina circulants

La disfunció de la barrera mucosa intestinal desencadena un increment de la permeabilitat. Aquesta situació condueix a incrementar el pas dels bacteris Gram-negatius des de la llum intestinal cap a la circulació. Els lipopolisacàrids que constitueixen la paret cel·lular d'aquests bacteris, generen, en arribar a la sang, el que es coneix com endotoxèmia.

Resultats

Amb l'objectiu de detectar quantitativament la presència d'endotoxina en el sèrum dels ratolins es va fer servir el kit d'ELISA *Mouse Endotoxin* (MyBiosource). Els ratolins del grup amb CU induïda per DSS van mostrar uns nivells incrementats d'endotoxina en sèrum, en comparació amb el grup blanc. En el grup de ratolins en tractament amb C4BP(β -) els nivells d'endotoxina van resultar significativament menors respecte el grup DSS i van assolir el mateix nivell que el grup blanc. En el grup de tractament amb minociclina es va observar un lleuger augment en les concentracions d'endotoxina en sèrum amb valors heterogenis entre els diferents animals (Figura 54).

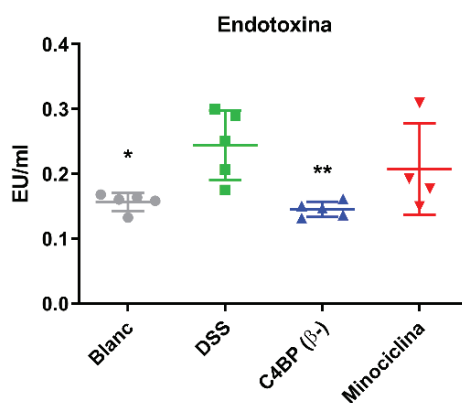


Figura 54. Nivells d'endotoxina sèrica en els ratolins amb CU induïda per DSS

Els nivells d'endotoxina es van mesurar per ELISA en les mostres de sèrum obtingudes el dia de sacrifici. Els valors estan expressats com la mitjana \pm SD. $n=4-5$ ratolins/grup, realitzat per duplicat. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecte DSS.

De forma general, C4BP(β -) va mantenir l'expressió de les proteïnes de les unions estretes, reduint el dany en la barrera intestinal i evitant l'endotoxèmia induïda pel DSS.

4.2.6 C4BP(β -) modula el perfil transcripcional de marcadors d'inflamació aguda característics de la CU en el teixit intestinal

L'anàlisi comparatiu a nivell transcripcional va revelar, de forma rellevant, una expressió incrementada dels transcrits *Prtn3*, *S100a8*, *S100a9* i *Haptoglobin* en el teixit intestinal dels ratolins del grup DSS respecte el grup blanc. Contràriament, en el grup DSS es va veure una expressió disminuïda del transcrit *Ppar γ* (Figura 55).

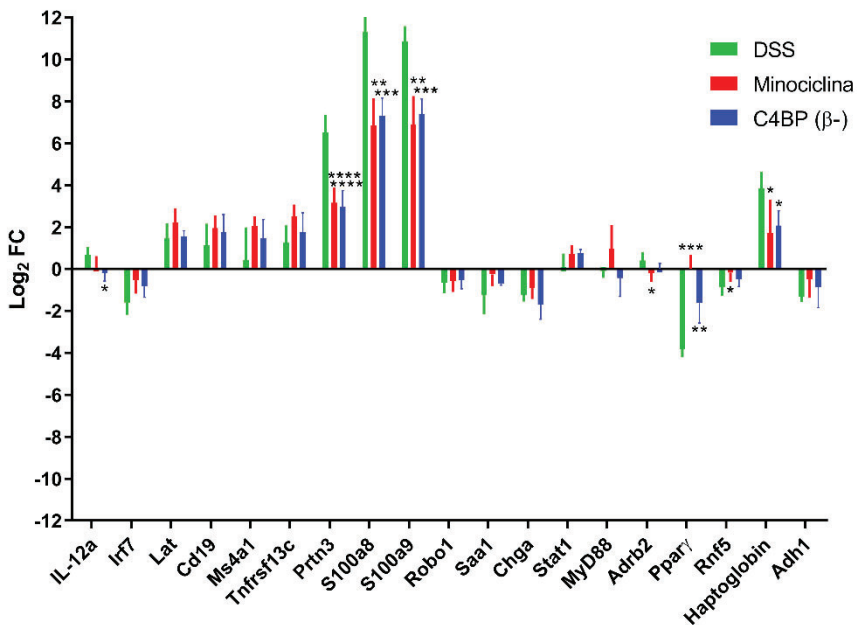


Figura 55. Anàlisi transcripcional de marcadors inflamatoris en mostres individuals de teixit intestinal per RT-qPCR en el model murí de CU induïda per DSS

Expressió relativa dels transcrits gènics analitzats per RT-qPCR amb sondes TaqMan en RNA procedent de mostres del colon per cada grup de tractament normalitzat pel grup blanc, sense malaltia. Els valors del Log₂FC s'expressen com la mitjana \pm SD. n=4 ratolins/grup. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 comparat amb DSS.

Com s'ha explicat anteriorment, els transcrits *S100a8* i *S100a9* codifiquen per a l'heterodímer S100a8/S100a9 (calprotectina). L'expressió d'aquesta proteïna juga un paper crític en la inducció del reclutament de neutròfils i la seva migració cap als llocs d'inflamació. Tanmateix, *Prtn3* codifica per a una serina proteasa que s'expressa principalment en aquesta població de cèl·lules mieloides. En conjunt i de forma

Resultats

rellevant, els transcrits marcadors de neutròfils van resultar sobre-expressats amb la inducció de la malaltia per DSS i van disminuir de forma significativa amb el tractament amb C4BP(β -) i minociclina.

De fet, aquest resultat es va validar amb un ELISA específic en mostres de proteïna procedent del colon i es va comprovar que els nivells de calprotectina, elevats en les mostres de ratolins amb CU induïda per DSS, disminuïen de forma significativa en les mostres dels ratolins tractats amb C4BP(β -) i minociclina (Figura 56).

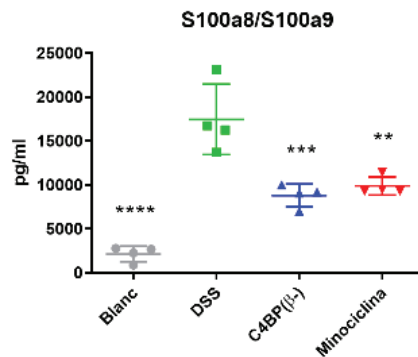


Figura 56. Nivells de S100a8/S100a9 (calprotectina) en teixit intestinal

L'expressió gènica diferencial dels transcrits *S100a8* i *S100a9* es va validar amb un ELISA específic per a calprotectina en mostres individuals. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SD. $n=4$ ratolins/grup, realitzat per duplicat. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ respecte DSS.

En concordança amb aquests resultats, l'expressió del transcrit *Rnf5*, que codifica per la ubiquitina lligasa E3, expressada per les cèl·lules epitelials intestinals, que marca la proteïna S100a8 per a la seva degradació, mostrava una expressió disminuïda en el grup DSS i es va recuperar en els grups de tractament, tot i que només el grup tractat amb minociclina va assolir la significació estadística.

L'expressió del transcrit que codifica per l'haptoglobina es va incrementar en el grup d'animals amb CU induïda per DSS. La síntesi d'aquesta proteïna s'indueix per citocines pro-inflamatòries innates com IL-1 β , IL-6 i TNF- α . De fet, els nivells d'haptoglobina s'utilitzen com a marcador plasmàtic d'inflamació sistèmica en aquest model experimental (312) ja que esdevé una proteïna inflammatòria majoritària en la

resposta de fase aguda (326). El tractament amb C4BP(β -) i minociclina va disminuir l'expressió d'aquest transcrit.

Per últim, d'entre els transcrits analitzats també es va observar una disminució de l'expressió de *Ppary*, una característica prèviament reportada en pacients amb CU (327). De fet, una expressió reduïda de *Ppary* junt amb una senyalització incrementada de TLR4 en les cèl·lules epitelials intestinals de pacients amb CU condueixen a una alteració de la tolerància a LPS en la llum intestinal que resulta en inflamació superficial a nivell del colon (328), el que confereix a aquest receptor nuclear un paper rellevant en aquesta malaltia. La *downregulació* del transcrit *Ppary* es va mostrar mitigada de forma significativa amb el tractament amb C4BP(β -) i minociclina.

4.2.7 C4BP(β -) modula el perfil de citocines i quimiocines sèriques en el model murí de CU aguda induïda per DSS

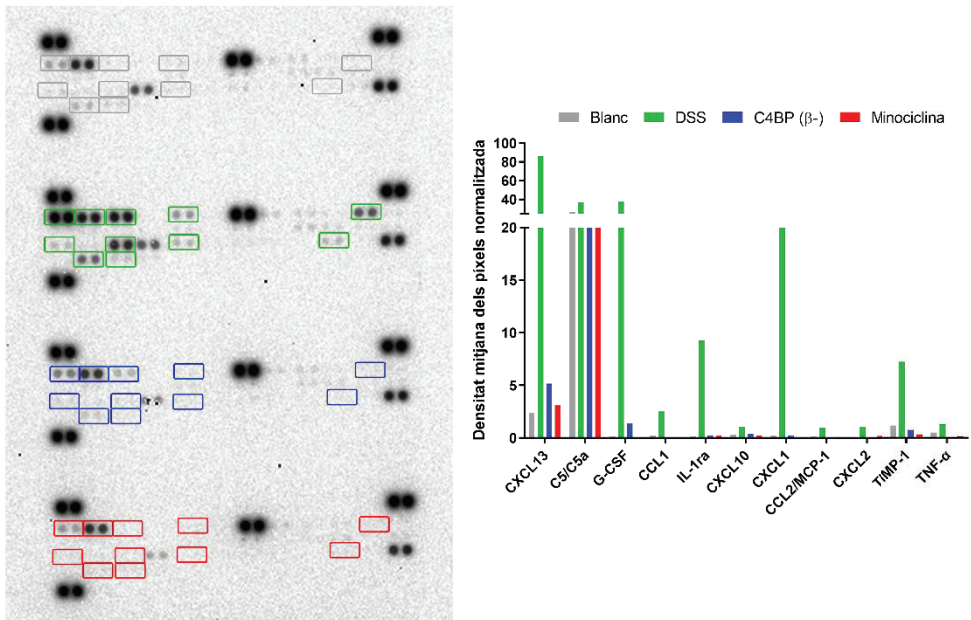
Donat el seu paper crucial en els processos inflamatoris i concretament, en el desenvolupament de la CU, es va analitzar la presència de citocines en les mostres de sèrum obtingudes el dia del sacrifici. Els resultats van revelar nivells incrementats de tota una sèrie de citocines i quimiocines, amb rols crucials en la inducció de la resposta inflamatòria i del reclutament de cèl·lules immunitàries, en els ratolins del grup DSS respecte el ratolins sense CU (**Figura 57A**). Així, el grup amb CU va mostrar uns nivells incrementats d'IL-1ra i TNF- α , del factor estimulant de colònies de granulòcits (G-CSF), que estimula la producció de granulòcits, del component C5/C5a del sistema de complement, relacionat amb la mobilització de neutròfils, i de les quimiocines CXCL1 i CXCL2, implicades en la patogènesi de les malalties inflamatòries intestinals (329) amb uns nivells incrementats en les àrees inflamades del colon (330), com a factors quimiotàctics de neutròfils cap als llocs d'inflamació i de teixit danyat. Les quimiocines CCL1 i CCL2, que tenen un paper inductor en el reclutament i la migració de monòcits, DCs i limfòcits T cap als llocs d'inflamació, també van mostrar uns nivells incrementats. Així com de CXCL10, que té un paper inhibidor de la proliferació de les cèl·lules epitelials de les criptes intestinals, la continua renovació de les quals és indispensable per mantenir l'homeòstasi intestinal; de fet el seu bloqueig protegeix contra el desenvolupament de la CU aguda en ratolins (331). En aquests ratolins del

Resultats

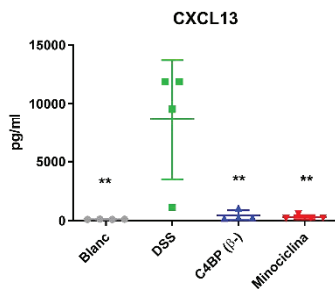
grup DSS, els nivells sèrics de l'inhibidor 1 de metal·loproteases (TIMP-1) també es trobaven incrementats. En concordança, TIMP-1 es troba sobre-expressat en àrees inflamades i ulceratives del colon per inhibir l'expressió incrementada de metal·loproteases responsables de la degradació de matriu extracel·lular i la producció d'úlceres en la capa mucosa i submucosa del colon, i la seva expressió correlaciona amb la severitat de la malaltia (332, 333). Per últim, la quimiocina CXCL13, que ja vam descriure que tenia un paper rellevant en el model animal de LES, va mostrar en aquest model una expressió incrementada rellevant en els animals amb CU induïda per DSS. L'expressió d'aquestes citocines i quimiocines en sèrum va disminuir considerablement o es mostrava absent en el grup de tractament amb C4BP(β -) i el grup tractat amb minociclina.

La quimiocina CXCL13 actua com a potent atractant de cèl·lules B i està involucrada, com hem vist prèviament, en la formació de teixit limfoide compost per fol·licles de cèl·lules B, àrees de cèl·lules T i entre ells, fDCs. De fet, aquesta quimiocina es produeix i s'acumula en els teixits limfoides associats a l'intestí (GALT) en condicions normals però també juga un paper rellevant en la formació d'agregats limfoides aberrants en les lesions produïdes en la CU (334). L'elevada concentració de quimiocina CXCL13 en el grup de ratolins amb CU induïda per DSS, que va mostrar una concentració disminuïda en el grup tractat amb C4BP(β -) i amb minociclina, es va validar amb un ELISA específic en mostres individuals de sèrum (**Figura 57B**) i teixit intestinal (**Figura 57C**). Així es va confirmar que CXCL13 presentava una concentració elevada en les mostres de sèrum i teixit procedent del colon en els animals amb CU induïda per DSS i que el tractament amb minociclina i C4BP(β -) disminuïa la concentració d'aquesta quimiocina de forma significativa fins assolir uns valors negligibles.

A



B



C

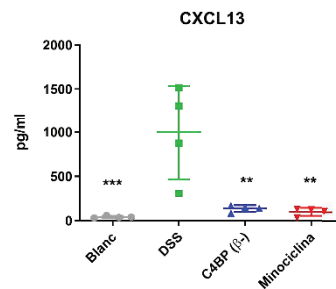


Figura 57. Perfil de citocines i quimiocines sèriques en els diferents grups del model murí experimental de CU induïda per DSS

(A) Les mostres de sèrum obtingudes el dia del sacrifici van ser incubades amb el *Proteome Profiler Mouse Cytokine Array* (R&D Systems) d'acord amb les instruccions del fabricant. De dalt a baix: grup blanc, grup amb CU induïda per DSS sense tractament, ratolins amb CU induïda per DSS tractats amb C4BP(β-) i ratolins amb CU induïda per DSS tractats amb minociclina. La densitat de cada punt va ser quantificada mitjançant el software *Quantity One* (Bio-Rad) i és presentada com a densitat mitjana dels pixels normalitzada amb els punts de referència, per cada citocina rellevant i tractament. Les citocines expressades diferencialment es troben indicades amb un rectangle en les membranes i estan representades en els gràfics segons l'ordre de lectura. Per a les citocines sICAM-1, M-CSF i CXCL12 també es va observar senyal però no es van observar diferències entre els diferents grups de tractament i per això no es van quantificar. Pools de 4 ratolins per grup. Les diferències en la concentració de CXCL13 es van validar en les mostres individuals de sèrum (B) i de proteïna total extreta de colon (C). Les dades s'expressen com a valors de la mitjana ± SD. n=4 ratolins/grup; **p < 0.01, ***p < 0.001 respecte DSS.

4.2.8 C4BP(β -) disminueix la infiltració de cèl·lules immunitàries en el colon del ratolins amb CU induïda per DSS

El model de CU induïda per DSS es caracteritza per la infiltració de cèl·lules inflamatòries en el colon, una característica que es va revelar per l'estudi transcripcional, especialment en el cas de les cèl·lules innates de la línia mieloide, i que suggerien els nivells incrementats de citocines i quimiocines pro-inflamatòries circulants en els ratolins del grup DSS. Per aquest motiu, es va analitzar l'efecte de C4BP(β -) en el reclutament de cèl·lules immunitàries per immunohistoquímica. La immunotinció de les seccions de colon distal amb anticossos específics va revelar una elevada infiltració de cèl·lules mieloides: DCs (CD11c) i monòcits/macròfags (F4/80); i també, tot i que de forma més difusa, de cèl·lules B (BAFFR) en les seccions de colon dels ratolins amb CU induïda per DSS, respecte el grup blanc. Per contra, aquests marcadors es van presentar en menor grau, especialment a l'interior de les criptes intestinals, en els ratolins tractats amb C4BP(β -) i minociclina (**Figura 58**). Aquests resultats van demostrar que C4BP(β -) va inhibir el reclutament de cèl·lules immunitàries en el colon durant l'establiment de la malaltia, protegint el colon d'una resposta inflamatòria exacerbada.

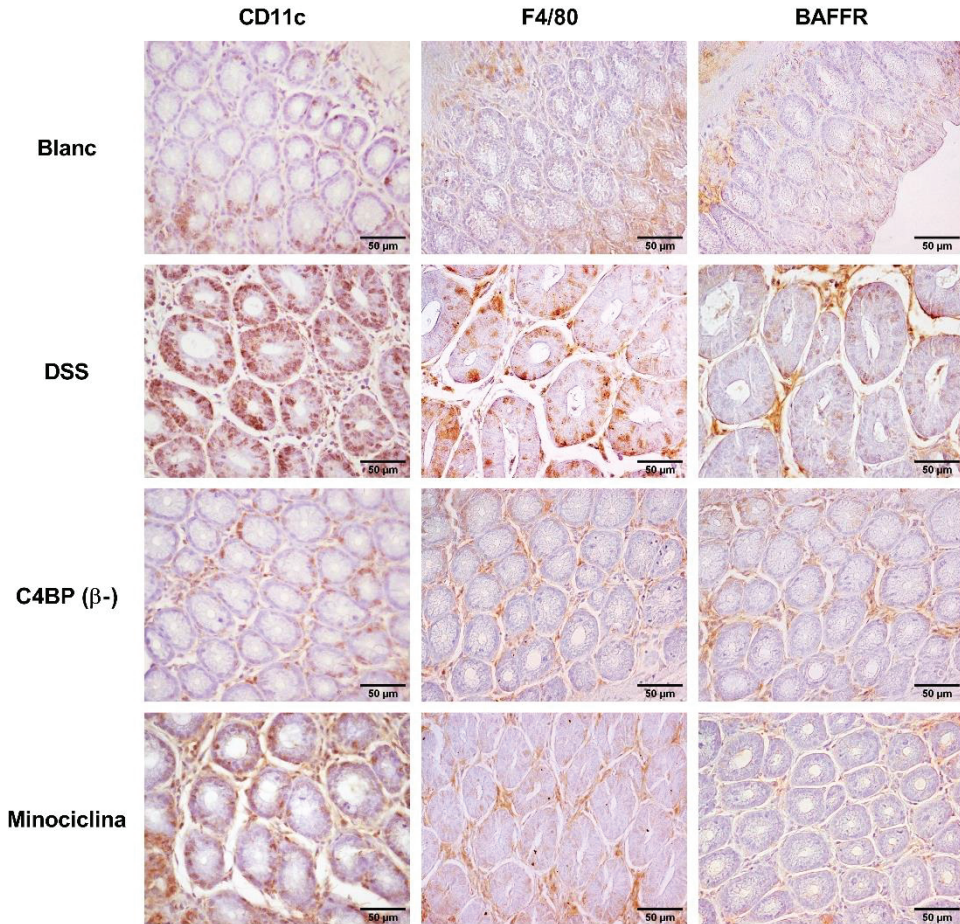


Figura 58. Immunohistoquímica en mostres de colon dels ratolins del model de CU induïda per DSS

Avaluació dels infiltrats de cèl·lules immunitàries en les seccions transversals del colon distal de ratolins C57BL/6/7 sans (blanc) o amb CU induïda amb DSS sense tractament (DSS), tractats amb C4BP(β-) i amb minociclina després de 9 dies d'estudi (escala: 50 μm). En les seccions del colon distal dels ratolins del grup DSS es va observar tinció local intensa per a cèl·lules immunitàries innates com DCs (CD11c) i monòcits/macròfags (F4/80) i també una tinció més difusa per a cèl·lules B (BAFFR) en la làmina pròpia de la capa mucosa. Contràriament, les seccions de colon distal dels ratolins tractats amb C4BP(β-) i minociclina (panells inferiors) presentaven una tinció lleu per als marcadors immunitaris referits. Els resultats de cada fila són representatius de la tinció realitzada sobre els teixits de 2-3 animals de cada grup.

4.3 Caracterització de l'activitat immunomoduladora de PRP6-HO7 sobre Mo-DCs

4.3.1 La cadena β interfereix en l'activitat immunomoduladora de C4BP

De totes les isoformes humanes de C4BP, només la isoforma minoritària C4BP(β -), però no la majoritària C4BP(β +), mostra una activitat no canònica anti-inflamatòria i tolerogènica sobre Mo-DCs (94). Sota condicions fisiològiques, totes les molècules de C4BP plasmàtica que contenen cadena β estan estretament unides a PS en una estequiometria 1:1 (335,336). Així, la isoforma C4BP(β +) purificada de plasma es troba en realitat present com un complex no covalent de gran afinitat, C4BP(β +)–PS. Mentre que la formació d'aquest complex no interfereix en la seva activitat principal en la inhibició del complement, atribuïda als dominis perifèrics N-terminals CCP1-CCP3 de les cadenes α , sí ho fa per a l'activitat no canònica associada al domini intern CCP6 de les cadenes α . Així doncs, per avaluar quin polipèptid, si PS o la cadena β de C4BP era responsable del bloqueig de l'activitat immunomoduladora no canònica absent en C4BP(β +), es va escindir PS del complex purificat format per C4BP(β +)–PS (337) i es van comparar els efectes fenotípics i funcionals d'ambdós tractaments, amb C4BP(β +)–PS i C4BP(β +) nua, sobre la diferenciació/maduració de les Mo-DCs. Aquest assaig en concret, es va realitzar sota condicions sense sèrum per evitar el reclutament de la PS bovina per C4BP(β +) nua, ja que s'ha descrit que la interacció entre C4BP humana i PS bovina té una afinitat 5 vegades major que la interacció entre C4BP humana i PS humana (120). Els anàlisis per Western Blot van confirmar que la isoforma C4BP(β +) nua estava efectivament desproveïda de PS (**Figura 59**).

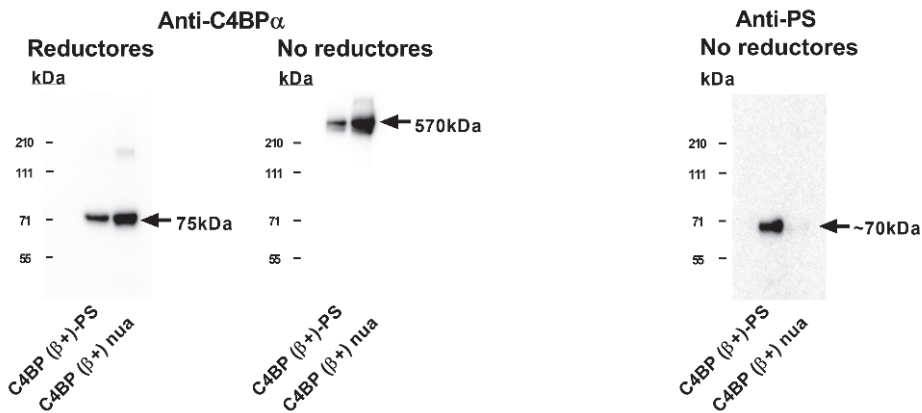


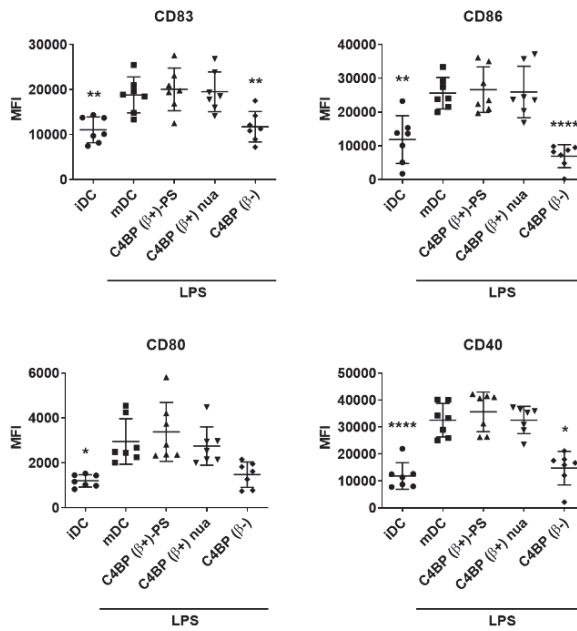
Figura 59. C4BP(β+) nua no presenta unida PS

Anàlisi per SDS-PAGE i Western Blot de la isoforma fisiològica majoritària, C4BP(β+) en complex amb PS (C4BP(β+)-PS), unida a través de la cadena β; o bé desproveïda de PS (C4BP(β+) nua). Ambdues proteïnes es van analitzar sota condicions reductores (esquerra) i sota condicions no reductores (al mig) amb anticòs anti-cadena α de C4BP (PK9008). Un altre Western Blot realitzat amb un anticòs anti-PS va confirmar l'absència de PS en la proteïna C4BP(β+) nua (dreta).

Contràriament a C4BP(β-), ni C4BP(β+)-PS ni C4BP(β+) nua van tenir la capacitat d'influir significativament en la sobre-expressió dels diferents marcadors d'activació en Mo-DCs induïts per LPS, incloent el marcador de maduració CD83 i les molècules coestimuladores CD86, CD80 i CD40 (**Figura 60A**). De forma anàloga, només C4BP(β-) però no C4BP(β+)-PS o C4BP(β+) nua va prevenir la secreció de les citocines pro-inflamatòries IL-12 i TNF-α, i contràriament, d'incrementar la producció de la citocina anti-inflamatòria IL-10 (**Figura 60B**).

En conjunt, aquests resultats van suggerir que la incorporació de cadena β en l'oligòmer que formen les cadenes α de C4BP és responsable de l'absència d'activitat immunomoduladora en la isoforma majoritària C4BP(β+) i que aquest efecte que exerceix la cadena β no requereix la incorporació de PS en el complex.

A



B

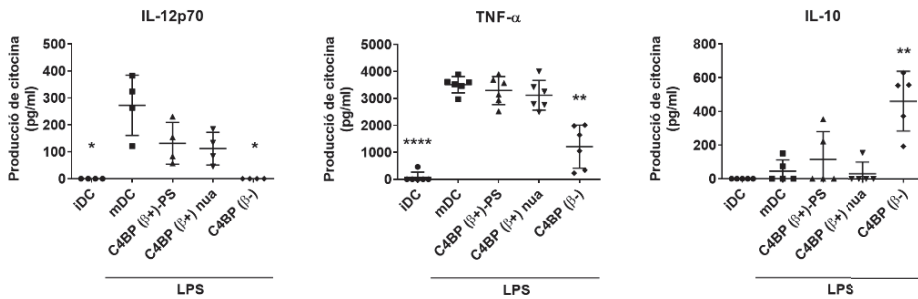


Figura 60. La cadena β de C4BP inhibeix l'activitat immunomoduladora del domini intern CCP6 de la cadena α

(A) Expressió de marcadors de superfície cel·lular en DCs tractades i estimulades amb LPS. Les Mo-DCs humanes van ser incubades durant el procés de diferenciació amb C4BP(β^+)-PS, C4BP(β^+) nua i C4BP(β^-), totes a 12 nM (corresponent amb 6 $\mu\text{g/ml}$, 5.3 $\mu\text{g/ml}$ i 5 $\mu\text{g/ml}$ respectivament). La maduració de les DCs es va assolir per estimulació amb LPS. Les cèl·lules es van recollir, rentar i analitzar per citometria de flux per a l'expressió del marcador de superfície cel·lular CD83 i les molècules co-estimuladores CD86, CD80 i CD40. MFI, intensitat mitjana de fluorescència per als diferents marcadors de superfície. (B) Les concentracions d'IL-12p70, TNF- α i IL-10 van ser analitzades en els respectius sobrednants dels cultius cel·lulars per ELISA, no tractades, DCs immadures; mDC, DCs no tractades, estimulades amb LPS; C4BP(β^+)-PS, C4BP(β^+) nua, C4BP(β^-), DCs pre-tractades amb les proteïnes respectives i estimulades amb LPS. Els resultats mostrats són mitjana \pm SD de 7 donants independents (marcadors de superfície cel·lular), o de 4-6 donants, realitzat per duplicat (citocines). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ respecte mDC.

4.3.2 La modularitat de C4BP permet la dissecció de la seva activitat immunomoduladora

Amb l'objectiu de disseccionar l'activitat no canònica immunomoduladora de C4BP(β -) de la seva activitat reguladora del complement, per confirmar la seva independència funcional, es van dissenyar i produir dues variants de C4BP recombinants: PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7, ambdues sense els tres dominis més externs, CCP1-CCP3, requerits per a la inhibició del complement (112). La variant PRP5/8-HO7 és un heptàmer que conté una versió truncada (CCP5-CCP8 amb el domini d'oligomerització C-terminal) de la cadena α de C4BP i la variant PRP6-HO7 és un heptàmer que conté només el domini CCP6 i el domini d'oligomerització C-terminal de la cadena α de C4BP (**Figura 61**). PRP5/8-HO7 és una variant més conservativa que PRP6-HO7 ja que només presenta deletats els dominis N-terminals CCP1-CCP4 de la cadena α de C4BP per prevenir problemes potencials d'un incorrecte plegament al voltant de CCP6 que podrien afectar a la seva activitat immunomoduladora.

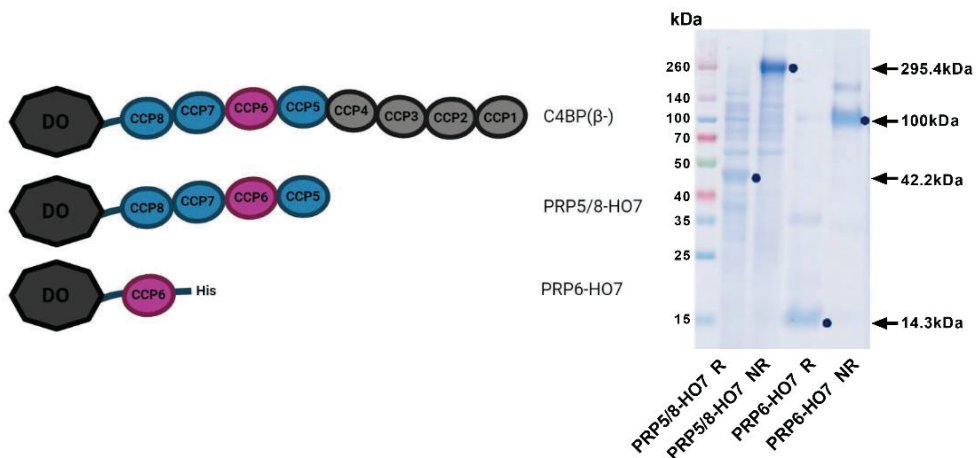


Figura 61. Disseny de les variants de C4BP recombinants: PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7

Esquerra: Representació esquemàtica de l'estructura de la cadena α de C4BP(β -) i de les seves variants PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7. Els dominis *complement control protein* (CCP)1-CCP3, representats en gris, presenten la funció inhibidora del complement. El domini CCP6, amb funció immunomoduladora, es troba representat en lila. El domini d'oligomerització (DO) s'ha representat en color negre. "His" fa referència al *tag* de poli-histidines localitzat en l'extrem N-terminal de PRP6-HO7. Dreta: Anàlisi per SDS-PAGE i tinció Coomassie Blue d'ambdues proteïnes PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7 sota condicions reductores (R) i no reductores (NR). Les fletxes negres i els punts blaus indiquen la localització i mida d'ambdues proteïnes en les seves formes reduïdes i no reduïdes. Carril esquerra: marcador de pes molecular. kDa: kilodalton.

Per avaluar comparativament l'activitat immunomoduladora de rC4BP(β -) completa i les seves variants amb delecions, PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7, les Mo-DCs es van pre-incubar a les concentracions indicades de cada proteïna o amb la isoforma C4BP(β +) inactiva i es van madurar amb l'estímul pro-inflamatori LPS. Com ja s'havia reportat anteriorment (94), rC4BP(β -) però no C4BP(β +), era capaç de conferir un fenotip semi-madur i anti-inflamatori en Mo-DCs estimulades per a la seva maduració amb LPS. Tanmateix, les variants de C4BP(β -) van mostrar també una activitat immunomoduladora comparable, confirmada pels nivells significativament inferiors dels marcadors de superfície CD83 i CD86 i la prevenció de la producció de les citocines pro-inflamatòries IL-12 i TNF- α en Mo-DCs estimulades amb LPS (**Figura 62**).

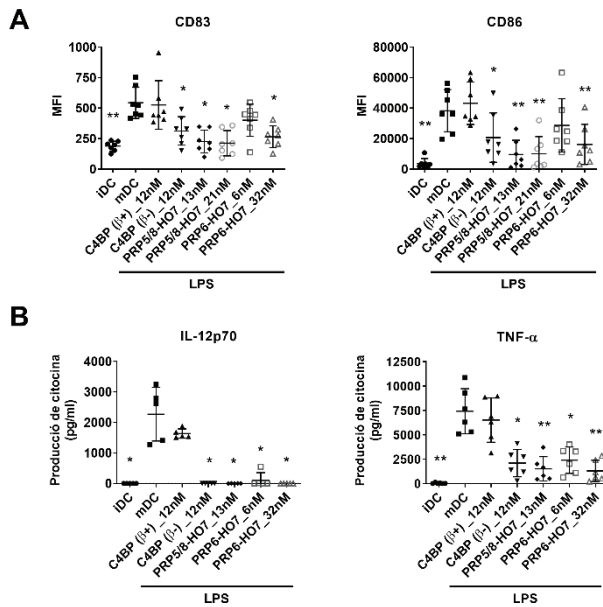


Figura 62. La deleción dels dominis associats a la inhibició del complement de C4BP(β -) no afecta a la seva activitat immunomoduladora

(**A**) Les Mo-DCs humanes van ser incubades durant el seu procés de diferenciació amb C4BP(β +), C4BP(β -) (ambdues a 12 nM) i les variants PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7 a les concentracions indicades. La maduració de les DCs es va assolir amb el tractament amb LPS. Les cèl·lules es van recollir, rentar, i analitzar per citometria de flux per a l'expressió del marcador de superfície cel·lular CD83 i la molècula co-estimuladora CD86. MFI, intensitat mediana de fluorescència per als diferents marcadors de superfície. (**B**) Les concentracions d'IL-12p70 i TNF- α van ser analitzades en els respectius sobrenedants dels cultius cel·lulars per ELISA. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades i madurades amb LPS; C4BP(β +), C4BP(β -), PRP5/8-HO7, PRP6-HO7, DCs pre-tractades amb les diferents proteïnes a les concentracions especificades i estimulades amb LPS. Els resultats mostrats són la mitjana \pm SD de 7 donants independents (marcadors de superfície cel·lular) o de 5-6 donants independents, realitzat per duplicat (citocines). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecte mDC.

Així, ambdues variants, PRP5/8-HO7 i PRP6-HO7, retenen de forma completa l'activitat immunomoduladora atribuïda a C4BP(β -), i PRP6-HO7 va ser seleccionada per continuar sent caracteritzada.

4.3.3 L'oligomerització és necessària per preservar l'activitat immunomoduladora de PRP6-HO7

PRP6-HO7 té una estructura heptamèrica predita anàloga a la isoforma fisiològica C4BP(β -) d'acord amb l'anàlisi de modelatge comparatiu d'estructures de proteïnes realitzat tenint en compte les dades estructurals disponibles d'estudis previs sobre els dominis CCP1 i CCP2 de la cadena α i del complex central heptamèric C-terminal de C4BP (315,316). Aquesta proteïna recombinant es mostra com una unitat compacta i simètrica composta per set dominis CCP6 units pel seu extrem C-terminal al domini d'oligomerització de C4BP formant un heptàmer radial no-glicosilat amb estructura de tipus aranya (Figura 63).

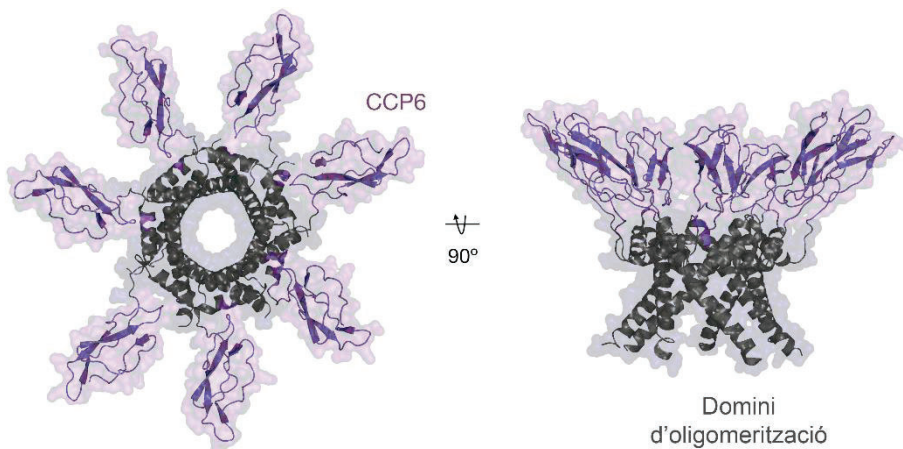


Figura 63. Modelatge molecular de PRP6-HO7

La predicció estructural de l'homo-oligòmer PRP6-HO7 es va realitzar per modelatge comparatiu d'estructures de proteïnes amb MODELLER. El domini CCP6 N-terminal i el domini d'oligomerització C-terminal es mostren en color lila i color negre respectivament. CCP: *complement control protein*.

Resultats

Per investigar si l'oligomerització del domini immunomodulador de C4BP, CCP6, és intrínsecament necessària per preservar la seva activitat immunomoduladora, es va comparar el resultat funcional del tractament amb la proteïna heptavalent PRP6-HO7 amb el d'una variant anàloga, PRP6-NO, formada pel domini CCP6 i un domini d'oligomerització mutat dissenyat amb una substitució de dos residus Cys (C498A/C510A) essencials pel correcte plegament i 13 aminoàcids C-terminals truncats (98).

Com s'esperava i es va confirmar per SDS-PAGE, sota condicions reductores i no reductores i tinció amb Coomassie Blue o amb anàlisi per Western Blot, PRP6-HO7 es plegava formant una estructura heptamèrica de 100 kDa composta per set cadenes monomèriques de 14.3 kDa, que inclouen el domini CCP6 i el domini d'oligomerització C-terminal de C4BP. D'altra banda, PRP6-NO no tenia la capacitat d'oligomeritzar sota condicions no reductores i es mantenia com a monòmer de 12.7 kDa (Figura 64).

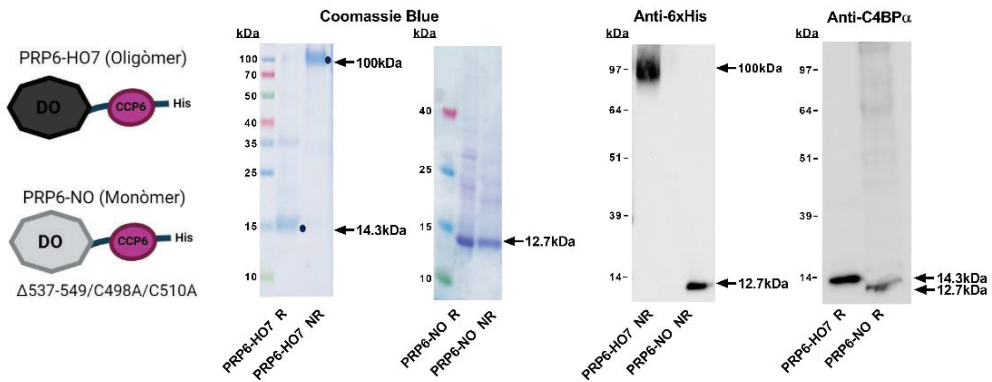


Figura 64. Anàlisi estructural de PRP6-HO7 i PRP6-NO

A l'esquerra es mostra esquemàticament l'estructura de la cadena monomèrica de l'heptàmer PRP6-HO7, i de PRP6-NO, incapaç d'oligomeritzar degut a un domini d'oligomerització (DO) truncat/mutat (color gris clar). PRP6-HO7 i PRP6-NO van ser visualitzades per SDS-PAGE i tinció Coomassie Blue (al mig) i anàlisi per Western Blot (a la dreta) amb anticossos anti-His i anti-cadena α de C4BP sota condicions reductores (R) (PRP6-HO7 monòmer, 14.3 kDa; PRP6-NO, 12.7 kDa) i condicions no reductores (NR) (PRP6-HO7 oligòmer, 100 kDa; PRP6-NO, 12.7 kDa). Les fletxes negres indiquen els respectius pesos moleculars. kDa: kilodalton.

Ambdós tractaments amb C4BP(β +) i PRP6-NO no van presentar cap efecte en l'expressió del marcador d'activació de DCs CD83 ni de la molècula co-estimuladora CD86 en Mo-DCs madurades amb LPS. Per contra, PRP6-HO7, de forma anàloga a C4BP(β -), reduïa significativament l'expressió d'aquests marcadors (**Figura 65A**). D'altra banda, la capacitat d'internalització d'antigen de les Mo-DCs es va avaluar per citometria de flux amb el marcador DQ-OVA (endocitosi mediada pel receptor de manosa). Així, l'activitat endocítica de les iDCs es va veure significativament incrementada pel tractament amb C4BP(β -) i PRP6-HO7 però no pel tractament amb la proteïna monomèrica PRP6-NO ni per la molècula inactiva C4BP(β +) (**Figura 65B**).

Posteriorment, es va avaluar si l'efecte de les diferents proteïnes basades en C4BP sobre el fenotip de les DCs anava acompanyat de canvis en l'alliberament de citocines pro-inflamatòries (IL-12 i TNF- α). En comparació amb les iDCs no tractades, la secreció de cadascuna d'aquestes citocines s'incrementava quan les iDCs s'estimulaven amb LPS. A més, les DCs pre-tractades amb C4BP(β +) i PRP6-NO secretaven el mateix nivell de citocines que les DCs no tractades després de la seva maduració. Per contra, el pre-tractament amb C4BP(β -) i PRP6-HO7 evitava l'alliberament d'IL-12 i disminuïa significativament l'alliberament de TNF- α (**Figura 65C**). Així, la producció de citocines pro-inflamatòries del tipus Th1 condicionada per l'estimulació amb LPS va disminuir de forma significativa en les DCs tractades amb PRP6-HO7.

Les Mo-DCs tractades amb les diferents molècules basades en C4BP es van mantenir amb una viabilitat elevada durant tot el procés de diferenciació i maduració, com es va comprovar pel marcatge amb 7-AAD, amb menys d'un 10% de cèl·lules apoptòtiques 48 hores després de la maduració induïda amb LPS.

En conjunt, aquestes dades van evidenciar que la proteïna oligomèrica PRP6-HO7, però no la proteïna monomèrica PRP6-NO, té potencial per modificar la diferenciació/maduració pro-inflamatòria de les DCs cap a un fenotip anti-inflamatori i tolerogènic.

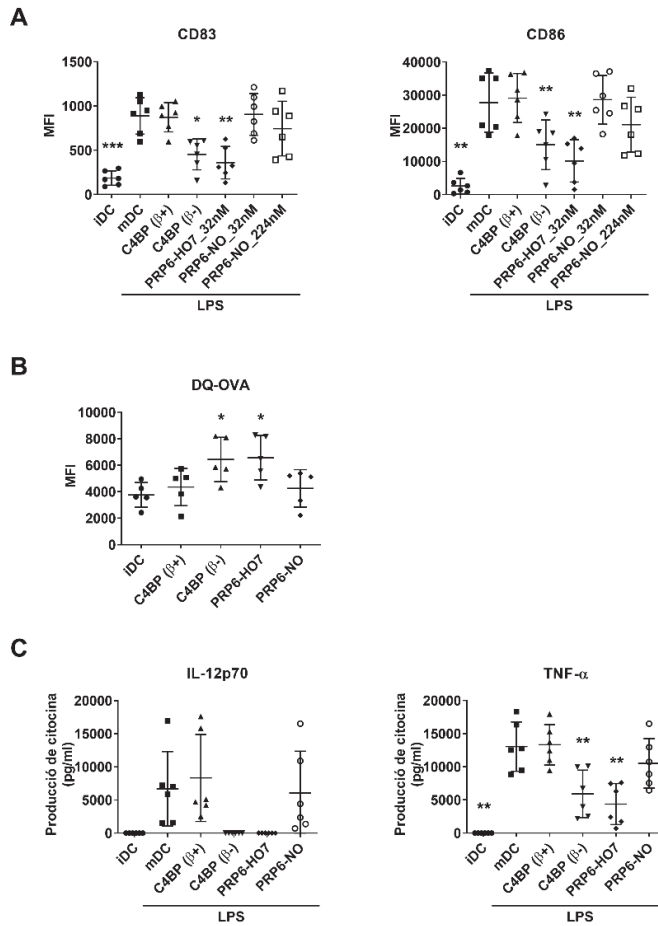


Figura 65. L'oligomerització és necessària per preservar l'activitat immunomoduladora del domini CCP6 de la cadena α de C4BP

(A) Les Mo-DCs humanes van ser incubades durant el procés de diferenciació amb C4BP(β+) i C4BP(β-) (ambdues a 12 nM) i les variants PRP6-HO7 i PRP6-NO (ambdues a 32 nM, excepte quan s'especifica). La maduració de les DCs es va assolir amb el tractament amb LPS. Les cèl·lules es van recollir 48 hores després i van ser analitzades per citometria de flux per a l'expressió del marcador d'activació CD83 i de la molècula co-estimuladora CD86. MFI, intensitat mediana de fluorescència per als diferents marcadors de superfície. Els resultats mostren la mitjana ± SD de 6 donants independents. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 respecte mDC. (B) Comparació de l'activitat endocítica de les Mo-DCs avaluada mitjançant citometria de flux, mesurant la internalització de DQ-OVA fluorescent (endocitosi mediada per receptor) en l'estadi de diferenciació, després del tractament amb C4BP(β+), C4BP(β-), PRP6-HO7 i PRP6-NO. Les dades es mostren com a mitjana de les MFIs ± SD de 5 experiments independents. *p < 0.05 comparat amb iDC. (C) Les concentracions d'IL-12p70 i TNF-α van ser analitzades per ELISA en els respectius sobrenedants dels cultius cel·lulars de (A), excepte la mostra PRP6-NO_224 nM. Els resultats mostrats són la mitjana ± SD de 6 donants independents, realitzat per duplicat. **p < 0.01, respecte mDC. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, DCs no tractades i madurades amb LPS; PRP6-HO7, PRP6-NO pre-tractades amb les diferents proteïnes a les concentracions especificades i madurades amb LPS si ho especifica.

4.3.4 PRP6-HO7 no presenta activitat inhibidora del complement

Una de les funcions reguladores principals de C4BP és el seu paper com a cofactor per la serina proteasa FI en la inactivació de C4b. Per confirmar que PRP6-HO7 es trobava desproveïda d'aquesta activitat inhibidora del sistema de complement, atribuïda als dominis CCP1-CCP3 de la cadena α , es va realitzar un assaig comparatiu sobre l'activitat com a cofactor de C4BP avaluant la seva contribució en l'escissió de C4b mediada pel FI en solució. Així, ambdues C4BP(β^+) i C4BP(β^-), però no PRP6-HO7 a cap de les concentracions testades, van mostrar capacitat d'actuar com a cofactor en l'escissió en la cadena α' de C4b que realitza el FI quan produeix el fragment d'escissió parcial de 70 kDa, α 3-C4d, i el fragment petit, produït per escissió completa, C4d, de 45 kDa (Figura 66).

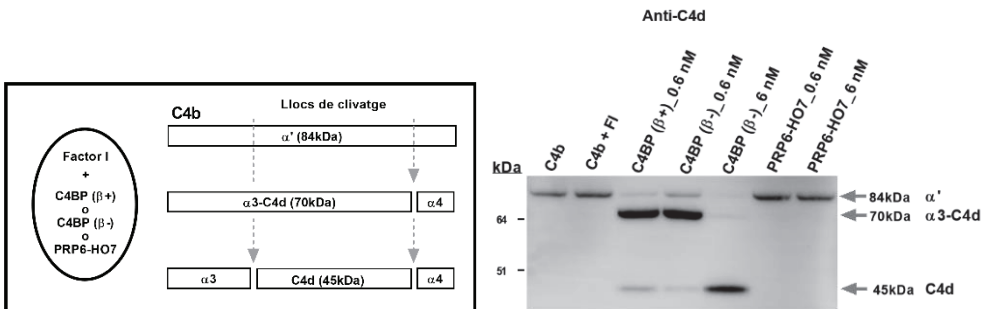


Figura 66. PRP6-HO7 no té activitat inhibidora del complement

A l'esquerra, representació esquemàtica del disseny experimental i de l'activitat com a cofactor de C4BP(β^+) i C4BP(β^-) en l'escissió de C4b per part del Factor I (FI). El FI escindeix la cadena α' de C4b en dues parts. L'escissió parcial genera el fragment α 3-C4d (70 kDa) mentre que l'escissió completa genera el fragment petit C4d (45 kDa). C4BP(β^+), C4BP(β^-) i PRP6-HO7, a les concentracions indicades (carrils 3-7) van ser incubades amb C4b (8.9 μ g/ml) seguit de l'addició del FI (4.4 μ g/ml). Com a controls de la reacció es van incloure C4b incubat sol i C4b amb FI. Totes les reaccions es van aturar després de 30 minuts amb tampó SDS reductor. Els fragments de C4b generats es van separar per SDS-PAGE amb gradient 4-12% sota condicions reductores i la identificació dels fragments es va realitzar per Western Blot (a la dreta de la figura) amb un anticòs monoclonal anti-C4d. Les fletxes de color gris indiquen la mida dels fragments derivats de C4b. L'activitat cofactora va ser confirmada per l'aparició dels fragments α 3-C4d (70 kDa) o C4d (45 kDa). Els resultats són representatius de tres experiments independents. kDa: kilodalton.

4.3.5 PRP6-HO7 atenua l'activació de les Mo-DCs induïda via TLRs

En aquest cas, es va avaluar si PRP6-HO7 tenia la capacitat de reprimir o limitar l'expressió dels diferents marcadors d'activació superficials de monòcits i DCs, incloent CD83, CD86, CD80, CD40 i HLA-DR quan les iDCs s'estimulaven per a la seva maduració a través de TLR1 fins a TLR9, que reconeixen PAMPs i DAMPs capaços de desencadenar la presentació antigènica i de promoure l'habilitat d'activació eficient de les cèl·lules T. C4BP(β +) no va mostrar cap efecte en l'expressió de cap d'aquests marcadors en Mo-DCs estimulades amb els agonistes indicats de TLRs, mentre que ambdues proteïnes, C4BP(β -) i PRP6-HO7, disminuïen significativament, no només l'expressió de CD83 i CD86, com s'havia observat prèviament, també de les molècules co-estimuladores CD80 i CD40, i del receptor de superfície cel·lular de MHC de classe II, HLA-DR, en Mo-DCs activades per tots els agonistes de TLRs extracel·lulars (**Figura 67**) i intracel·lulars (**Figura 68**), excepte per TLR9, que no es troba expressat en aquestes cèl·lules (338).

Aquestes dades van confirmar que PRP6-HO7 té el potencial de prevenir la diferenciació/maduració pro-inflamatòria de les DCs induïda per TLRs com mostren els patrons d'expressió dels diferents marcadors de superfície cel·lular. Contràriament, ni PRP6-HO7 per si sola, ni PRP6-HO7 amb LPS només incubada des del dia 5 fins el dia 7 (maduració), tenen cap efecte en l'expressió dels marcadors de superfície de les DCs, com ja es va mostrar prèviament amb C4BP(β -) (94).

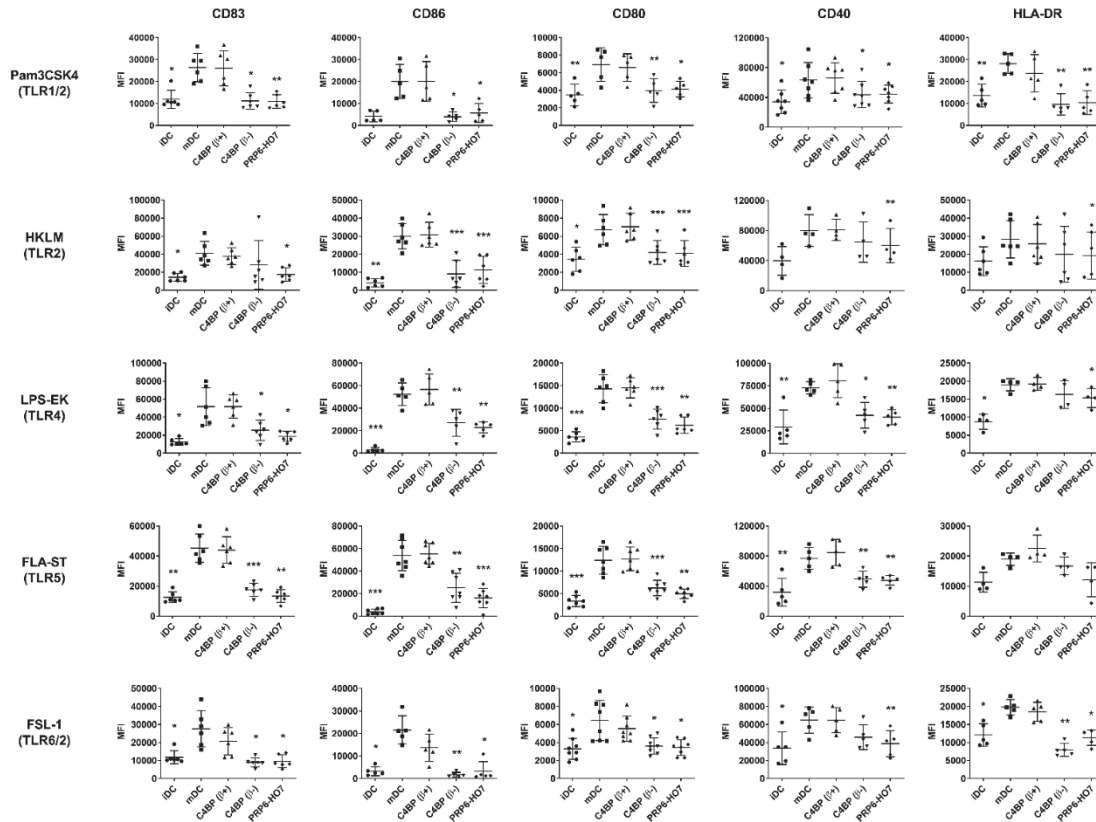


Figura 67. PRP6-HO7 evita l'activació pro-inflamatòria induïda via TLRs de superfície en Mo-DCs

Les Mo-DCs humanes van ser incubades durant el procés de diferenciació amb les proteïnes C4BP(β+) i C4BP(β-) (ambdues a 12 nM) i PRP6-HO7 (32 nM). La maduració de les DCs es va assolir amb el tractament dels agonistes de TLRs: Pam3CSK4 (TLR1/2), HKLM (TLR2), LPS-EK (TLR4), FLA-ST (TLR5) i FSL-1 (TLR6/2). Les cèl·lules es van recollir, rentar, i analitzar per citometria de flux per a l'expressió dels marcadors de superfície cel·lular CD83, CD86, CD80, CD40 i HLA-DR. MFI, intensitat mediana de fluorescència per als diferents marcadors de superfície cel·lular. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, DCs immadures, estimulades amb els agonistes de TLRs indicats; C4BP(β+), C4BP(β-), PRP6-HO7, DCs pre-tractades amb les proteïnes especificades i estimulades amb els agonistes de TLRs. Els resultats mostrats són la mitjana ± SD de 4-8 donants independents. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 respecte mDC.

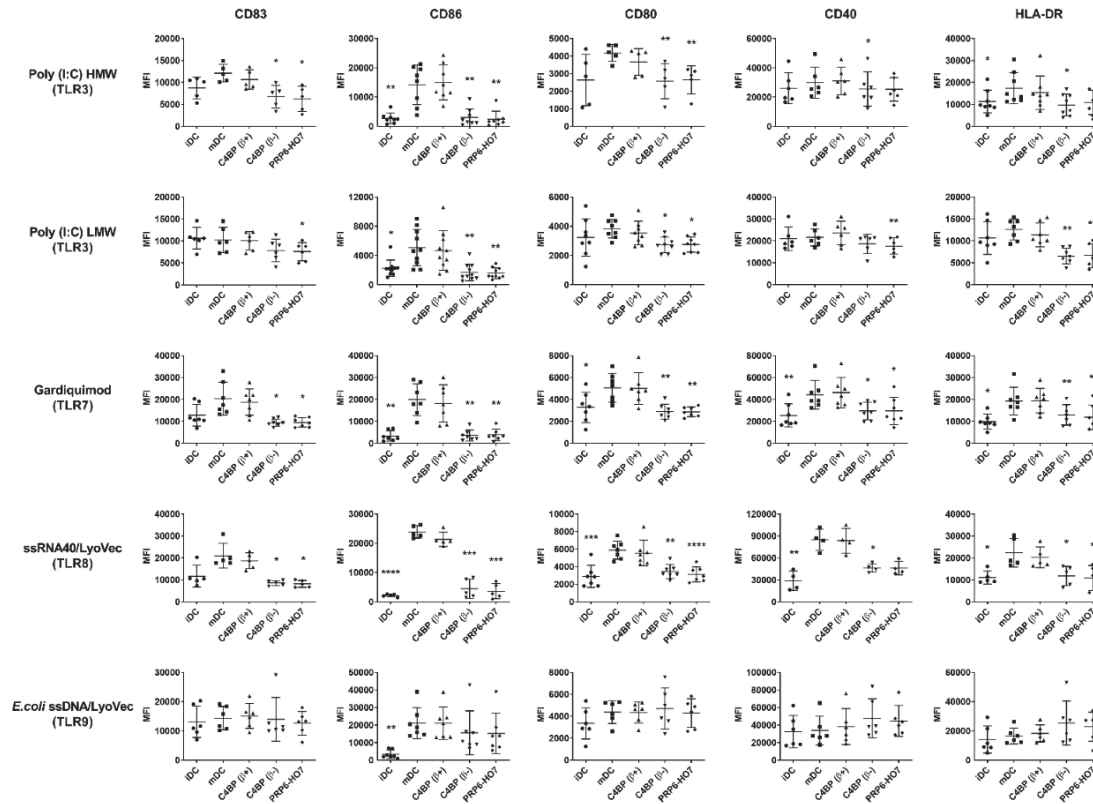


Figura 68. PRP6-HO7 evita l'activació pro-inflamatòria induïda via TLRs intracel·lulars (endosomals) en Mo-DCs

Les Mo-DCs humanes van ser incubades durant el procés de diferenciació amb les proteïnes C4BP(β+) i C4BP(β-) (ambdues a 12 nM) i PRP6-HO7 (32 nM). La maduració de les DCs es va assolir amb el tractament dels agonistes de TLRs: Poly I:C HMW (TLR3), Poly I:C LMW (TLR3), gardiquimod (TLR7), ssRNA40/LyoVec (TLR8) i *E. coli* ssDNA/LyoVec (TLR9). Les cèl·lules es van recollir, rentar, i analitzar per citometria de flux per a l'expressió dels marcadors de superfície cel·lular CD83, CD86, CD80, CD40 i HLA-DR. MFI, intensitat mitjana de fluorescència per als diferents marcadors de superfície cel·lular. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, estimulades amb els agonistes de TLRs indicats; C4BP(β+), C4BP(β-), PRP6-HO7, DCs pre-tractades amb les proteïnes especificades i estimulades amb els agonistes de TLRs. Els resultats mostrats són la mitjana ± SD de 4-10 donants independents. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 respecte mDC.

4.3.6 El sèrum humà no interfereix en l'activitat immunomoduladora de PRP6-HO7

Per conèixer el comportament de PRP6-HO7 en un entorn més complex, es va analitzar l'expressió dels marcadors CD83 i CD86 de la superfície cel·lular en DCs diferenciades i estimulades amb LPS en presència d'un 50% de sèrum humà autòleg. De forma anàloga al tractament amb C4BP(β -), PRP6-HO7 va mostrar capacitat per disminuir significativament l'expressió d'ambdós marcadors de forma dosi-dependent (**Figura 69**). Per tant, PRP6-HO7 és al menys tan activa com C4BP(β -), en relació a les seves propietats immunomoduladores, sota condicions més semblants a les que trobem en la circulació.

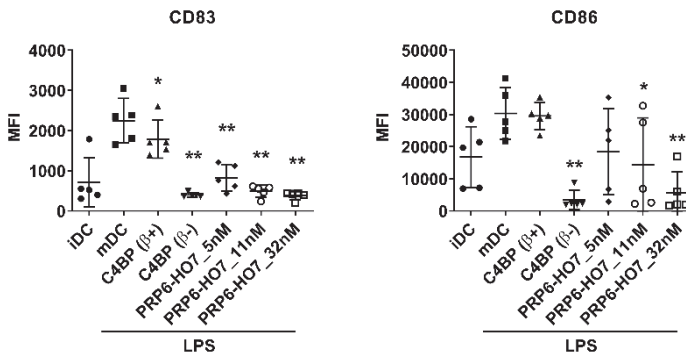


Figura 69. PRP6-HO7 disminueix l'expressió de CD83 i CD86 en Mo-DCs activades amb LPS i cultivades amb un 50% de sèrum humà

Les Mo-DCs humanes es van cultivar en medi RPMI1640 suplementat amb un 50% de sèrum humà autòleg i van ser incubades durant el procés de diferenciació amb C4BP(β +), C4BP(β -) (ambdues a 12 nM) i amb les concentracions indicades de PRP6-HO7. La maduració de les DCs es va assolir amb el tractament amb LPS. Les cèl·lules es van recollir, rentar i analitzar per citometria de flux per a l'expressió dels marcadors de superfície cel·lular CD83 i CD86. MFI, intensitat mediana de fluorescència per als diferents marcadors. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, DCs madurades amb LPS; C4BP(β +), C4BP(β -), PRP6-HO7, DCs pre-tractades amb les diferents proteïnes i estimulades amb LPS. Els resultats mostrats són la mitjana \pm SD de 5 donants independents. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecte mDC.

4.3.7 PRP6-HO7 modifica la quimiotaxi de Mo-DCs

Les senyals de maduració determinen el comportament de les DCs i modifiquen les seves funcions, com ara la migració a través dels nòduls limfàtics condicionada per quimiocines. Ambdós tractaments amb C4BP(β^-) i PRP6-HO7 van disminuir l'expressió del receptor de quimiocina CCR7 (**Figura 70A i 70B**). L'expressió reduïda de CCR7 en la superfície cel·lular va produir, a la seva vegada, una disminució significativa de la migració de les DCs estimulades amb LPS condicionada per la quimiocina CCL21 (**Figura 70C**). En canvi, l'estimulació amb LPS de les DCs no tractades o pre-tractades amb C4BP(β^+), va induir substancialment la migració en resposta a la quimiocina CCL21.

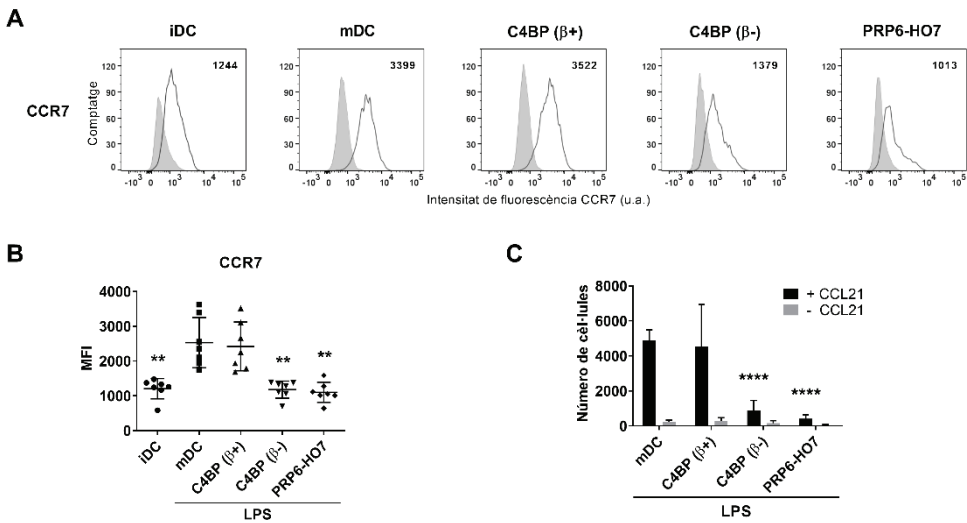


Figura 70. PRP6-HO7 disminueix l'expressió de CCR7 i modifica la quimiotaxi de les DCs

(A) Histogrames representatius de l'expressió en superfície de CCR7 en Mo-DCs tractades amb C4BP(β^+), C4BP(β^-) (ambdues a 12 nM) i PRP6-HO7 (32 nM) i estimulades amb LPS. L'isotip control es mostra en color gris. Es troben indicades les intensitats medianes de fluorescència (MFI) per a l'expressió en superfície cel·lular de CCR7. (B) Expressió de CCR7 mostrada com la mitjana \pm SD de 7 donants independents. ** $p < 0.01$ comparat amb mDC. (C) La migració de les DCs no tractades, tractades amb C4BP(β^+), C4BP(β^-) (ambdues a 12 nM) i PRP6-HO7 (32 nM) condicionada per la quimiocina CCL21 després de l'estimulació amb LPS es va avaluar en l'assaig amb *transwells*. Es mostra el comptatge absolut de DCs estimulades amb LPS (mDC) que van migrar cap a la cambra inferior amb CCL21 després de 2 hores d'incubació (columnes negres). La migració espontània de les DCs cap a la cambra inferior en absència de CCL21 també va ser avaluada (columnes de color gris). Els resultats són la mitjana \pm SD de 7 donants independents, realitzat per duplicat. **** $p < 0.0001$ comparades amb mDC. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, DCs madurades amb LPS; C4BP(β^+), C4BP(β^-), PRP6-HO7, DCs pre-tractades amb les diferents proteïnes i estimulades amb LPS. u.a.: unitats arbitràries.

4.3.8 Les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7 no indueixen l'al·loproliferació de cèl·lules T

Les Mo-DCs tolerogèniques generades pel tractament amb la isoforma C4BP(β -) alteren la proliferació de les cèl·lules T al·logèniques i la seva polarització cap a un fenotip Th1 (94). De forma anàloga, es va examinar la capacitat immunoestimuladora de les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7. Quan les Mo-DCs eren pre-incubades amb la isoforma C4BP(β +) i madurades amb LPS s'observava una proliferació màxima de cèl·lules T al·logèniques, de forma similar als resultats observats en Mo-DCs no tractades, estimulades amb LPS per a la seva maduració. Per contra, les Mo-DCs madures, pre-incubades amb PRP6-HO7 van prevenir la proliferació de les cèl·lules T CD3⁺ (Figura 71A i 71B) i la producció d'INF- γ (Figura 71C), assolint els nivells observats quan eren co-cultivades amb iDCs. Així, les DCs tractades amb PRP6-HO7 limiten l'al·loproliferació de les cèl·lules T.

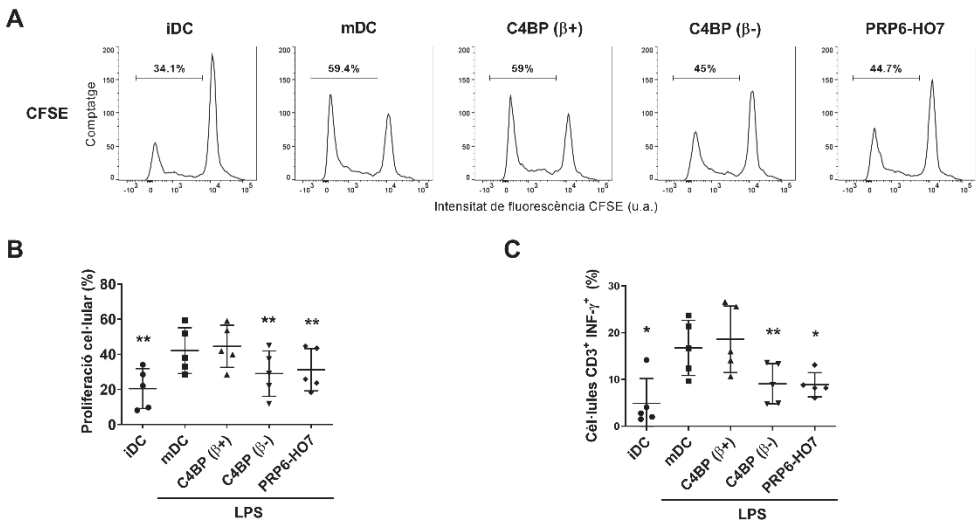


Figura 71. Les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7 limiten la proliferació de cèl·lules T i la producció d'INF- γ

Les cèl·lules T CD3⁺ al·logèniques es van marcar amb CFSE i van ser co-cultivades amb DCs tractades amb C4BP(β +) i C4BP(β -) (ambdues a 12 nM) i PRP6-HO7 (32 nM) i estimulades amb LPS, en una proporció MoDC/cèl·lula T d'1:5. (A) Histogrames representatius on s'indica el percentatge de cèl·lules que han proliferat i han perdut la fluorescència del CFSE. (B) Quantificació en percentatge de la proliferació de les cèl·lules T al·logèniques. (C) Percentatge de cèl·lules T CD3⁺ productores d'INF- γ . Els resultats mostrats són la mitjana \pm SD de 5 donants independents. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, DCs madurades amb LPS; C4BP(β +) i C4BP(β -), DCs pre-tractades amb les diferents proteïnes i estimulades amb LPS, totes en co-cultiu amb cèl·lules T CD3⁺ al·logèniques purificades. * p < 0.05, ** p < 0.01, respecte mDC. u.a.: unitats arbitràries.

4.3.9 PRP6-HO7 modula l'activació intrínseca i mediada per TLRs de les Mo-DCs de pacients amb LES autoimmunitari actiu

Com s'ha explicat anteriorment, el LES és un desordre autoimmunitari complex caracteritzat per una pèrdua de tolerància a autoantígens, una producció incrementada d'autoanticossos i l'acumulació, principalment renal, d'ICs que fixen el complement. Com una prova preliminar per avaluar el potencial immunomodulador de PRP6-HO7 en malalties autoimmunitàries en humans, es va realitzar un estudi pilot en dues petites cohorts de pacients amb LES, la majoria amb NL activa, anomenades cohort 1 i cohort 2.

Les característiques demogràfiques i clíniques de la cohort 1 s'especifiquen a la **taula 23**. En aquesta cohort, es va examinar si les Mo-DCs dels pacients amb LES actiu responien a la immunomodulació induïda per PRP6-HO7.

Característiques dels pacients	n total	mitjana / n	±SD / %
Edat (anys)	11	47.3	13.5
Sexe (% femení)	11	8	72.7
Fumadors	11	6	54.5
Dislipèmia	11	6	54.5
Hipertensió	11	4	36.4
Diabetis mellitus II	11	0	0
SLEDAI	11	16.8	10.2
NL	11	9	81.8
Brot	11	8	72.7
Eritròcits (x10 ¹² /L)	11	3.8	0.7
Hemoglobina (g/L)	11	114.2	22.3
Plaquetes (x10 ⁹ /L)	11	268.5	125.8
Leucòcits (x10 ⁹ /L)	11	6.7	3.2
Limfòcits (x10 ⁹ /L)	11	0.9	0.5
Monòcits (x10 ⁹ /L)	11	0.5	0.3
Urea (mmol/L)	7	13.4	8.4
Creatinina (µmol/L)	11	160.1	141.4
Taxa de filtració glomerular (ml/min)	11	59.5	31.7
Albúmina (g/L)	11	34.7	7.2
Ferritina (µg/L)	10	475.2	530.2
Proteïna C-reactiva (mg/L)	11	17.2	32.6
Proteinúria (g/24h)	7	1.9	2.4
Proteïna/creatinina (g/mol)	3	347.5	330
Hematúria (eritròcits/µl)	8	191.9	508.1
IgG (mg/L)	4	10460	2394.7
IgA (mg/L)	4	2931.3	1179.7
IgM (mg/L)	4	547	228.6

C3 (mg/L)	11	736	242.5
C4 (mg/L)	11	107.6	57.4
Factor B (mg/L)	3	273	48.1
Ab anti ssDNA (kint.u./L)	11	417.2	610.9
Ab anti-nucleosomes (kint.u./L)	4	92.5	51
Ab anti-C1q (kint.u./L)	2	9.5	10.6
Ab anti-SS-A (Ro60) (CU)	6	239.8	556.2
Ab anti-SS-A (Ro52) (CU)	6	49.8	75.9
Ab anti-SS-B (La) (CU)	5	3.3	0
Ab anti-RNP (U1) (CU)	6	51.6	112.5
Ab anti-Sm (CLIA) (CU)	6	14.4	18
Tractament immunosupressor	11	7	63.6
Tractament amb hidroxicloroquina	11	6	54.5
Tractament inhibidor de JAK	11	0	0
Tractament inhibidor de BAFF	11	2	18.2
Tractament amb esteroides/corticoides	11	8	72.7
Tractament amb vitamina D	11	4	36.4

Taula 23. Característiques clíniques dels pacients de LES de la cohort 1

Els monòcits aïllats d'aquests pacients, tant els no tractats com els tractats amb C4BP(β +), C4BP(β -) o PRP6-HO7, van ser diferenciats a DCs i posteriorment estimulats amb LPS, lligand de TLR4, o amb gardiquimod, agonista de TLR7. Com s'ha mostrat prèviament, C4BP(β -) i PRP6-HO7 van exercir una activitat immunomoduladora significativa sobre Mo-DCs d'individus sans quan eren madurades amb els estímuls pro-inflamatoris, LPS o gardiquimod (**Figures 67 i 68**). De forma anàloga, les DCs generades a partir dels monòcits aïllats de pacients amb NL activa, tractades amb C4BP(β -) i PRP6-HO7 i madurades amb LPS o gardiquimod, mostraven una reducció de l'expressió dels marcadors d'activació superficials (CD83, CD86, CD80 i CD40) i dels nivells de citocines pro-inflamatòries com TNF- α i IL-12 (aquesta última només a través de l'activació amb LPS, encara que no va assolir la significació estadística) (**Figura 72**).

Resultats

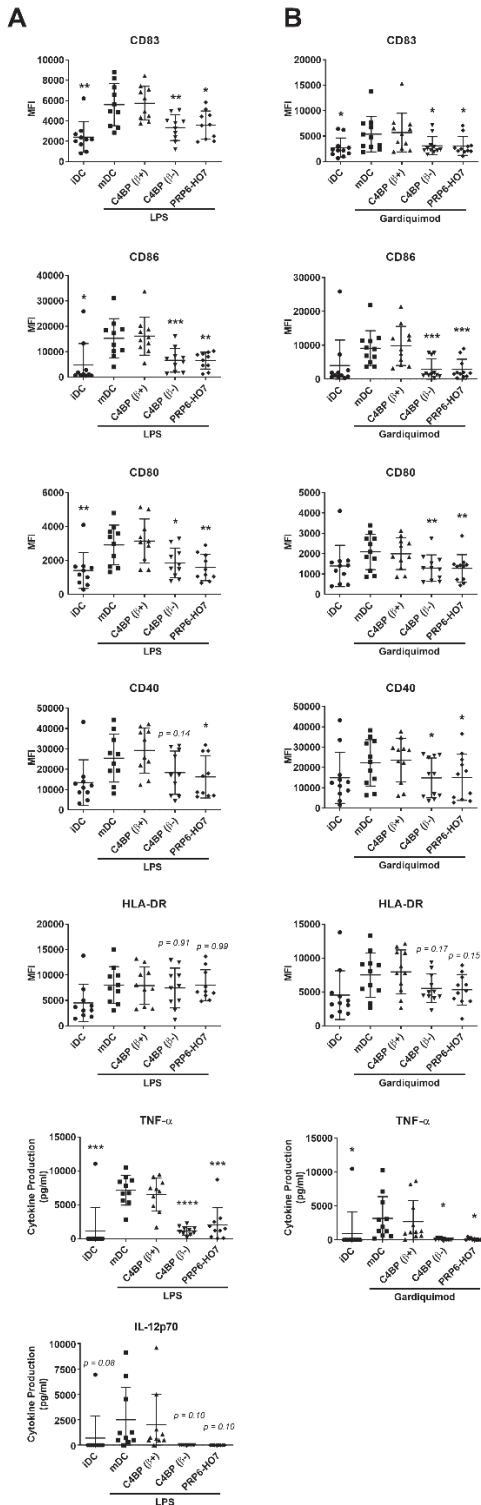


Figura 72. PRP6-HO7 mostra activitat immunomoduladora sobre Mo-DCs de pacients de LES

Les Mo-DCs obtingudes de pacients amb LES actiu (cohort 1) van ser incubades durant el seu procés de diferenciació amb C4BP(β^+), C4BP(β^-) (ambdues a 12 nM) i PRP6-HO7 (32 nM). La maduració de les DCs es va assolir amb LPS (**A**) o gardiquimod (**B**). Les cèl·lules es van recollir, rentar i analitzar per citometria de flux per a l'expressió superficial del marcador d'activació CD83 i de les molècules co-estimuladores CD86, CD80 i CD40, i per HLA-DR. MFI, intensitat mediana de fluorescència per als diferents marcadors de superfície. Les concentracions d'IL12p70 i de TNF- α van ser analitzades en els respectius sobrenedants dels cultius cel·lulars per ELISA. Els resultats mostrats són la mitjana \pm SD de 10 (LPS) o 11 (gardiquimod) donants independents. iDC, no tractades, DCs immadures; mDC, no tractades, DCs madurades amb LPS/gardiquimod; C4BP(β^+), C4BP(β^-), PRP6-HO7, DCs pre-tractades amb les diferents proteïnes i estimulades amb LPS/gardiquimod. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, respecte mDC.

Les característiques demogràfiques i clíniques de la cohort 2 s'especificuen a la **taula 24**. En aquesta cohort de pacients amb LES, la majoria durant un brot de NL, es va explorar si PRP6-HO7 podia revertir l'estat d'activació intrínseca d'aquestes cèl·lules. Amb aquest objectiu, es van analitzar els nivells d'expressió intrínseca dels marcadors de superfície distintius en Mo-macròfags no activats (M0) (CD64) i en Mo-DCs immadures (iDC) (CD83, CD86, CD80, CD40 i HLA-DR).

Característiques dels pacients	n total	mitjana / n	±SD / %
Edat (anys)	10	48.8	14.8
Sexe (% femení)	10	7	70
Fumadors	10	4	40
Dislipèmia	10	6	60
Hipertensió	10	3	30
Diabetis mellitus II	10	1	10
SLEDAI	10	19	10.5
NL	10	8	80
Brot	10	8	80
Eritròcits (x10 ¹² /L)	10	3.8	0.6
Hemoglobina (g/L)	10	115.9	17
Plaquetes (x10 ⁹ /L)	10	219.7	66.3
Leucòcits (x10 ⁹ /L)	10	7.9	2.7
Limfòcits (x10 ⁹ /L)	10	1.1	0.7
Monòcits (x10 ⁹ /L)	10	0.6	0.3
Urea (mmol/L)	7	11.5	5.9
Creatinina (µmol/L)	10	163.7	134.9
Taxa de filtració glomerular (ml/min)	10	56.1	27.2
Albúmina (g/L)	10	33.7	7.9
Ferritina (µg/L)	9	544.5	573.3
Proteïna C-reactiva (mg/L)	10	14.5	34.4
Proteinúria (g/24h)	5	0.7	0.6
Proteïna/creatinina (g/mol)	5	308.1	259.4
Hematúria (eritròcits/µl)	8	232.9	495.2
IgG (mg/L)	5	8741	3833.3
IgA (mg/L)	5	2266.6	643.7
IgM (mg/L)	5	809.4	408.1
C3 (mg/L)	10	717.1	249.8
C4 (mg/L)	10	117.8	51.6
Factor B (mg/L)	5	239.4	66.6
Ab anti ssDNA (kint.u./L)	10	98.1	102.6
Ab anti-nucleosomes (kint.u./L)	3	67.7	58.9
Ab anti-C1q (kint.u./L)	3	24.3	22.9
Ab anti-SS-A (Ro60) (CU)	6	236.8	557.6
Ab anti-SS-A (Ro52) (CU)	6	55.8	72.5
Ab anti-SS-B (La) (CU)	5	3.3	0
Ab anti-RNP (U1) (CU)	6	49.8	113.3
Ab anti-Sm (CLIA) (CU)	6	3.3	0

Resultats

Tractament immunosupressor	10	5	50
Tractament amb hidroxicloroquina	10	6	60
Tractament inhibidor de JAK	10	1	10
Tractament inhibidor de BAFF	10	0	0
Tractament amb esteroides/corticoides	10	8	80
Tractament amb vitamina D	10	3	30

Taula 24. Característiques clíniques dels pacients de LES de la cohort 2

Tot i que el número de pacients analitzats era petit, l'expressió dels marcadors de superfície esmentats, que reflecteixen l'estat d'activació inflamatòria d'aquestes cèl·lules, va correlacionar amb els paràmetres clínics típics d'activitat de la malaltia en la NL. Així, a partir de les dades clíniques disponibles, d'entre les proteïnes del complement, el Factor B va correlacionar negativament amb CD83, CD86, CD80 i CD40, C3 va correlacionar negativament amb CD83, i C4 va mostrar una tendència cap a la correlació negativa amb CD83 i CD86. En quant a les immunoglobulines circulants, els nivells d'IgG van correlacionar negativament amb CD83 i CD86, i els nivells d'IgA amb CD80. Per contra, els nivells d'IgM van correlacionar de forma positiva amb CD80. Els nivells d'anticossos anti-C1q van mostrar una correlació negativa amb CD80 i CD40, i els d'anticossos anti-nucleosomes van correlacionar negativament amb CD83. Pel que fa a les poblacions de cèl·lules immunitàries, el nombre de leucòcits en sang va mostrar una tendència a la correlació positiva amb CD86 i CD40 i, particularment, el nombre de limfòcits va correlacionar positivament amb CD80 i CD40. El nombre de plaquetes va mostrar una tendència a la correlació positiva amb CD80. Finalment, els paràmetres bioquímics com la creatinina sèrica va correlacionar negativament amb CD80, l'albumina sèrica amb CD64 i CD83, i la ferritina sèrica amb CD80 i CD40, mentre que el filtrat glomerular va mostrar una correlació positiva amb CD80. No es van observar correlacions significatives amb els nivells d'expressió d'HLA-DR (**Figura 73**).

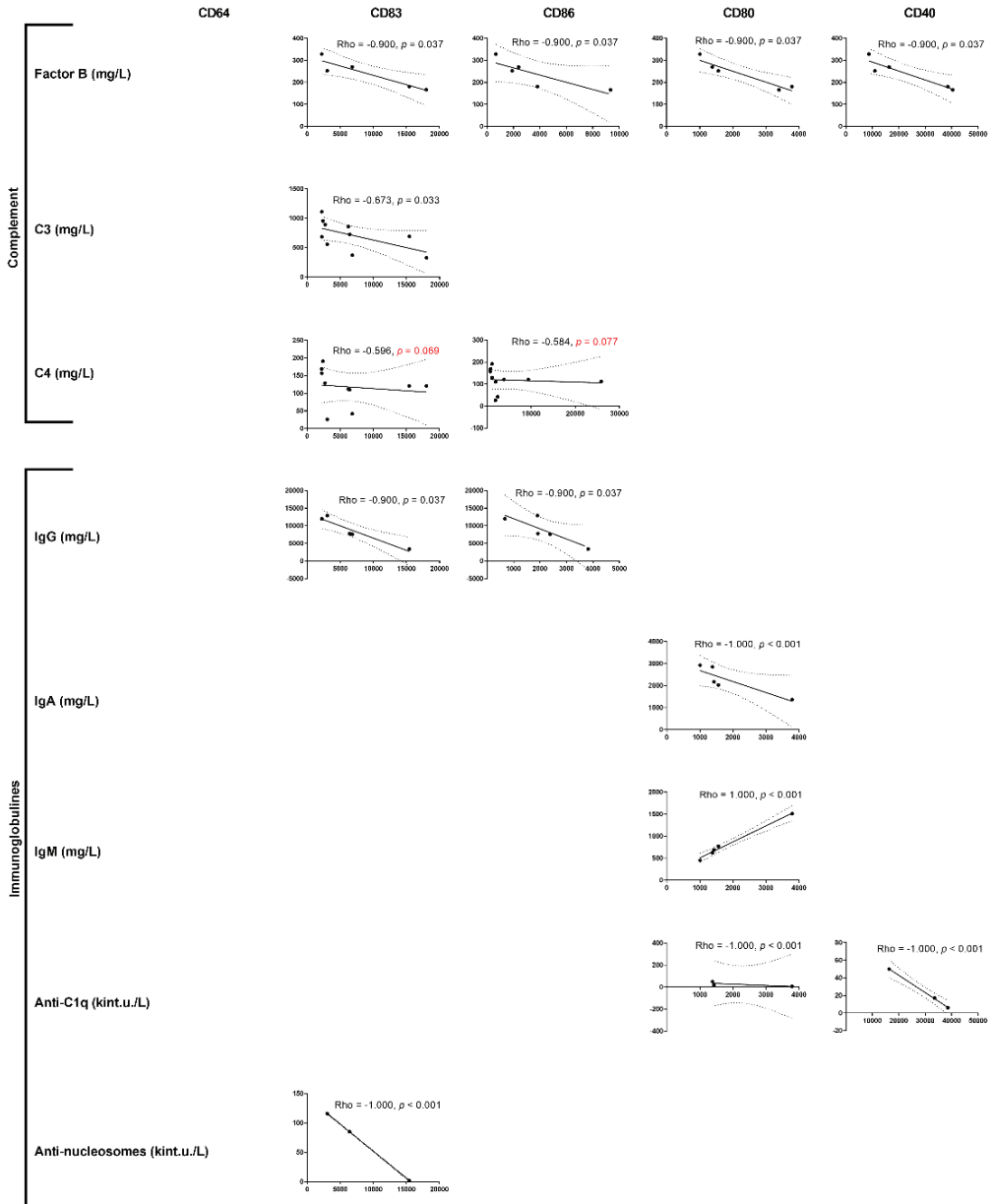


Figura 73. L'expressió dels marcadors de superfície cel·lular en Mo-DCs i Mo-macròfags correlaciona amb les característiques clíniques de l'activitat de la malaltia nefrítica en pacients de LES

Continua a la pàgina següent.

Resultats

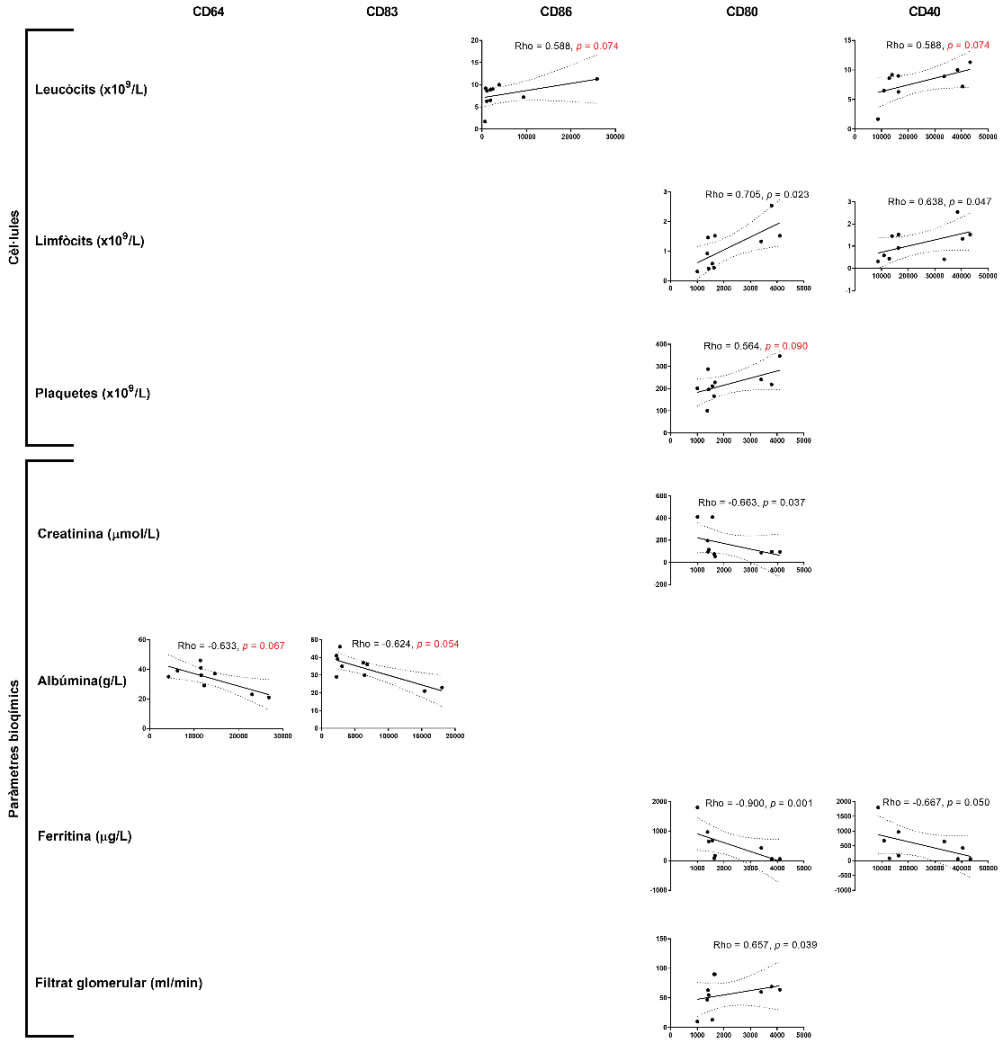


Figura 73. L'expressió dels marcadors de superfície cel·lular en Mo-DCs i Mo-macròfags correlaciona amb les característiques clíniques de l'activitat de la malaltia nefrítica en pacients de LES

Imatge en forma de matriu que mostra les correlacions trobades entre els marcadors de superfície analitzats (CD64, CD83, CD86, CD80 i CD40) i les dades clíniques obtingudes de la cohort 2 de pacients de LES, incloent els components del complement (Factor B, C3 i C4), les immunoglobulines (IgG, IgA, IgM, anticossos anti-C1q i anticossos anti-nucleosomes), cèl·lules de la sang (leucòcits, limfòcits i plaquetes) i paràmetres bioquímics (creatinina sèrica, albúmina sèrica, ferritina sèrica i filtrat glomerular). Els coeficients de correlació i els p-valors (en vermell quan s'aproximen al nivell de significació estadística) es troben destacats en cadascuna de les correlacions.

Considerant aquests resultats es van establir uns llindars d'activació per a cadascun dels marcadors de superfície analitzats. Així, comparant amb les iDC i M0 no tractades obtingudes a partir dels monòcits aïllats dels pacients, les cèl·lules tractades amb PRP6-HO7 mostraven una reducció significativa dels nivells i/o el percentatge de cèl·lules positives per cadascun dels marcadors analitzats (Figura 74).

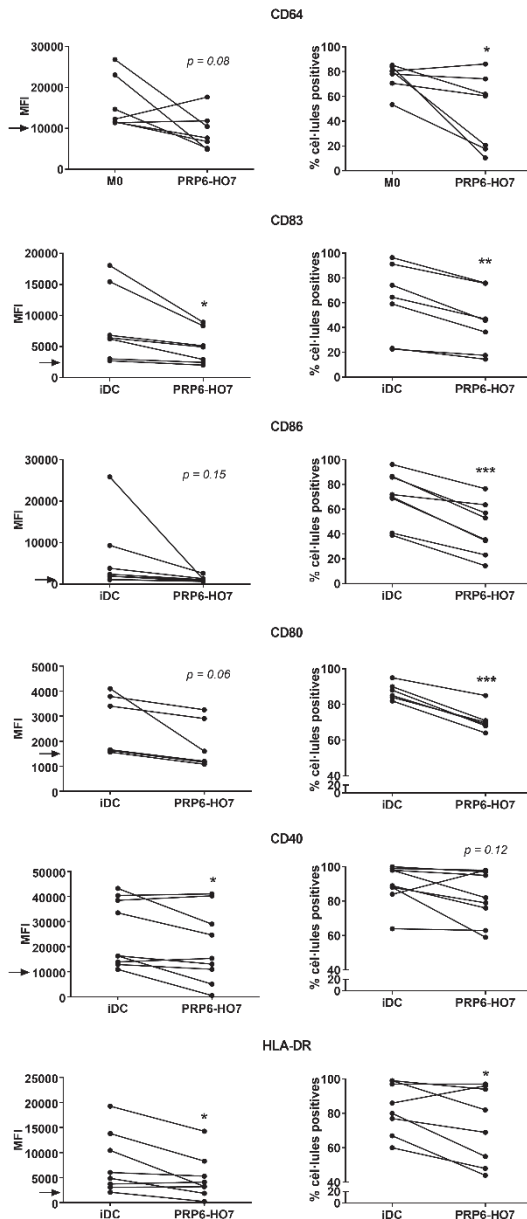


Figura 74. PRP6-HO7 modula els marcadors d'activació de la superfície cel·lular intrínsecament activats en Mo-DCs i Mo-macròfags de pacients de LES autoimmunitari actiu

Les Mo-DCs i Mo-macròfags humans de pacients de LES actiu (cohort 2) es van diferenciar sense tractament o van ser incubades amb PRP6-HO7 (32 nM) durant aquest procés. Les cèl·lules es van recollir, rentar i analitzar per citometria de flux per a l'expressió en superfície cel·lular dels marcadors d'activació CD64 (M0), o CD83 i de les molècules co-estimuladores CD86, CD80 i CD40, i per HLA-DR (iDC). Tant la intensitat mediana de fluorescència (MFI) com el percentatge de cèl·lules positives per als diferents marcadors de superfície cel·lular es troben indicats. Les fletxes vermelles indiquen la MFI que s'ha fet servir com a llindar d'activitat considerat per a cada marcador superficial (CD64: 10 000, CD83: 2 500, CD86: 1 000, CD80: 1 500, CD40: 10 000, HLA-DR: 2 000). Els resultats mostrats són la mitjana \pm SD de 6-9 donants independents. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparat amb M0 o iDC.

En conjunt, aquestes dades suggereixen que PRP6-HO7 és capaç d'immunomodular les cèl·lules immunitàries inflammatòries dels pacients amb NL autoimmunitària activa, independentment del seu historial mèdic.

4.3.10 PRP6-HO7 millora els trets patològics macroscòpics i histopatològics en el model murí de CU aguda induïda per DSS

PRP6-HO7 es va fer servir com a tractament experimental en el model de CU aguda induïda per DSS (**Figura 29**, veure apartat **3.3.6** en **Metodologia**), prèviament ja establert al laboratori, per avaluar, de forma preliminar, la seva eficàcia com a immunomodulador en un model *in vivo* d'inflamació.

Com s'esperava, els ratolins que van rebre un 2% de DSS van mostrar una pèrdua de pes que es va evidenciar a dia 6 i s'accentuava en els dies posteriors coincidint amb un increment de la puntuació DAI diària en aquest grup, en comparació amb el grup blanc que va beure aigua sense DSS al llarg de l'experiment. El tractament a dies 4, 6 i 8 d'experiment, amb C4BP(β -) i PRP6-HO7 va aturar la pèrdua de pes a partir de dia 7, que es va revertir de forma significativa durant els dies 8 i 9 respecte el grup DSS, coincidint amb una disminució de la puntuació DAI diària. El grup tractat amb minociclina no va millorar aquestes dades de forma significativa. El valor de l'AUC del DAI, que reflexa el valor global del DAI obtingut al llarg de tots els dies d'experiment, es va reduir en els grups de tractament tot i que no va assolir la significació estadística (**Figura 75A**).

Els anàlisis histopatològics dels talls longitudinals de teixit intestinal a nivell del colon distal en els ratolins del grup DSS van mostrar característiques d'inflamació severa en la capa mucosa, amb alteració estructural de les criptes, disminució de la quantitat de cèl·lules de Goblet i pèrdua de l'epiteli intestinal. També es va evidenciar infiltració leucocitària en la làmina pròpia de la mucosa i en la capa submucosa, desenvolupant fins i tot, petits fol·licles limfoides aïllats. L'administració de C4BP(β -) i PRP6-HO7 va alleujar el dany en el colon a nivell histològic, conservant una estructura de la capa mucosa i submucosa pràcticament intacta i disminuint, a la seva vegada, la formació d'aquests fol·licles limfoides en el colon d'aquests ratolins (**Figura 75B**).

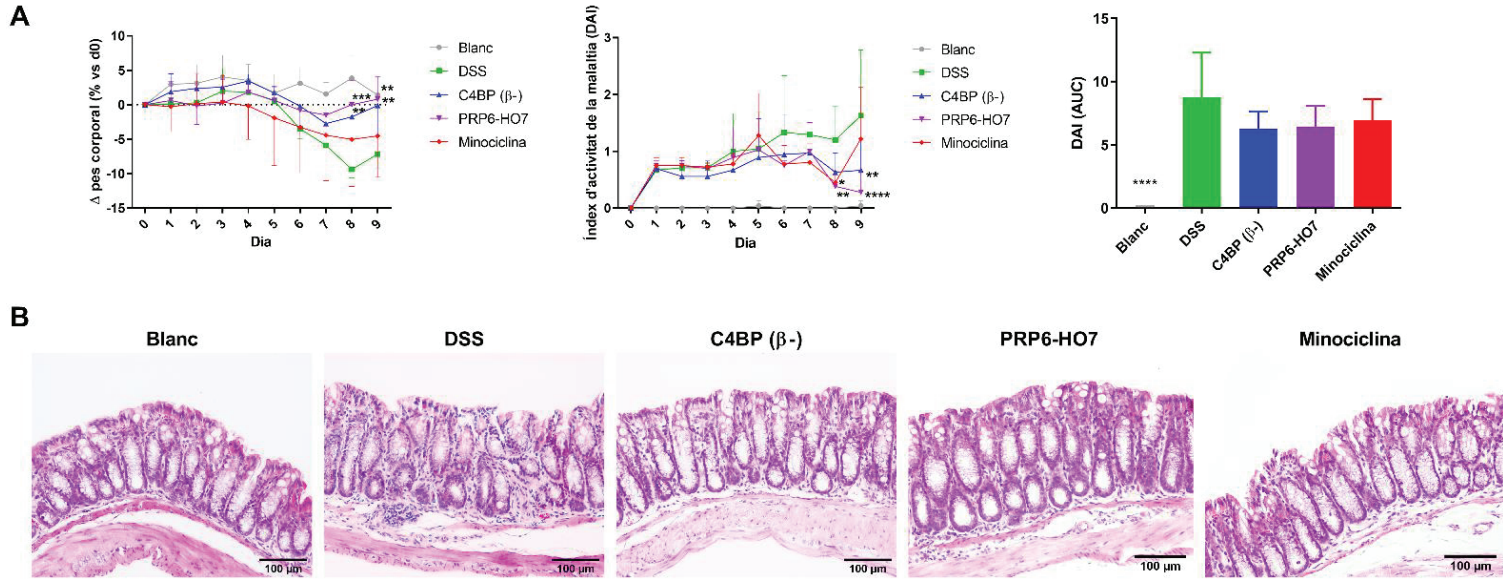
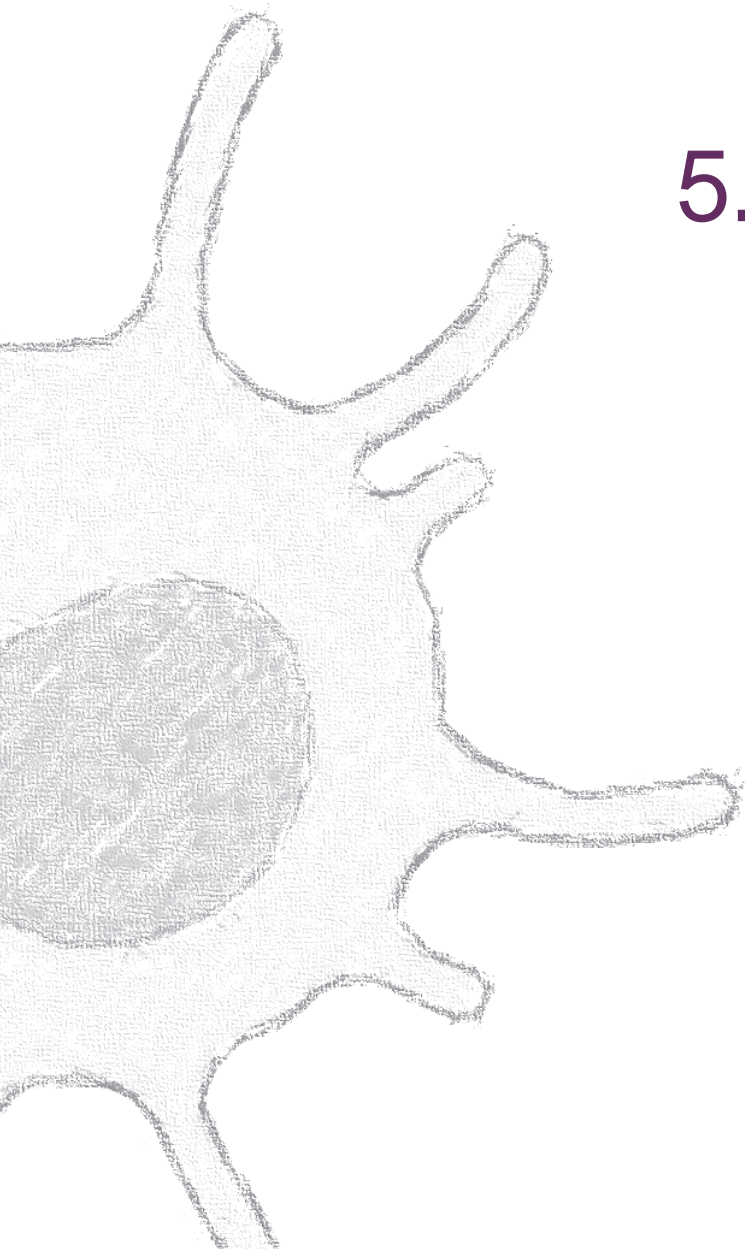


Figura 75. PRP6-HO7 millora els trets patològics associats a l'activitat inflammatòria i preserva l'estructura histològica del colon distal en el model murí de CU induïda per DSS

(A) Variació (Δ) del pes corporal (% de pes corporal perdut o guanyat respecte dia 0) (a dalt) al llarg dels 9 dies d'estudi en tots els grups experimentals. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SD. Blanc i DSS, n=4; C4BP(β^-), PRP6-HO7 i minociolina, n=6. **p < 0.01, ***p < 0.001 comparat amb DSS. L'estadística del grup blanc en comparació amb el grup DSS no s'inclou en el gràfic, *p < 0.05, a dies 6 i 7; ****p < 0.0001 a dia 8 i **p < 0.01 a dia 9. En els gràfics de la dreta es mostren els efectes del tractament amb C4BP(β^-) i PRP6-HO7 en l'evolució de la puntuació del DAI en els ratolins amb CU induïda per DSS. C4BP(β^-) i PRP6-HO7 (60 μ g/ratoli) van ser administrades a dies 4, 6 i 8 i els valors del DAI es van recollir durant els 9 dies d'experiment segons els criteris descrits en la **taula 16** (veure apartat **3.2.2 en Metodologia**). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 comparat amb el grup DSS. L'estadística del grup blanc no s'inclou en el gràfic, **p < 0.01, a dia 5; ****p < 0.0001 a dies 6, 7 i 9 i ***p < 0.001 a dia 8. L'AUC es va calcular amb els valors del DAI per a cada grup. ****p < 0.0001 comparat amb el grup DSS. (B) Seccions longitudinals representatives del colon distal dels ratolins a dia 9 d'estudi dels grups blanc, DSS, C4BP(β^-), PRP6-HO7 i minociolina (en ordre de d'esquerra a dreta) amb tinció d'hematoxilina i eosina que mostren les característiques histopatològiques de la CU (escala: 100 μ m).



5. DISCUSSIÓ

C4BP(β -) és una proteïna de fase aguda amb una coneguda funció com a regulador del sistema de complement i una funció recentment caracteritzada anti-inflamatòria i tolerogènica exercida per actuació directa sobre els fagòcits inflamatoris (94). En l'esmentat estudi, el tractament amb C4BP(β -) va evidenciar la inducció d'un fenotip semi-madur i tolerogènic en Mo-DCs generades *in vitro*, caracteritzat per uns nivells reduïts d'expressió dels marcadors d'activació i maduració, una disminució en la secreció de citocines pro-inflamatòries i una baixa capacitat d'estimulació de cèl·lules T al·logèniques, amb una capacitat incrementada per secretar citocines anti-inflamatòries i d'estimular la generació de cèl·lules Treg. Aquesta plasticitat de les DCs per respondre als agents immunomoduladors externs modificant el seu fenotip, el patró de secreció de citocines i la seva activitat estimuladora, també té lloc *in vivo* en funció dels factors microambientals, esdevenint crítics pel desenvolupament d'aquesta activitat multifacètica diferent i divergent, en la inducció d'immunogenicitat o tolerància que condiciona el comportament de la resposta immunitària adaptativa.

Nombrosos estudis en humans i ratolins han observat alteracions significatives en la freqüència, localització, fenotip i funció dels diferents subtipus de DCs en els pacients de LES (339,340). Per exemple, una freqüència disminuïda de cDCs i pDCs circulants en sang amb un increment de la seva acumulació en els teixits està associada amb inflamació i dany tissular (341). Les Mo-DCs de pacients de LES, mostren una diferenciació i maduració accelerada en comparació amb les Mo-DCs de controls, suggerint defectes intrínsecs en aquestes cèl·lules; tot i que els experiments en cultiu amb sèrum dels propis pacients evidencia la presència d'estímuls (autoantígens, ICs i IFN- α) que també alteren la seva diferenciació, maduració i funcionalitat, particularment en un estat actiu de la malaltia, pel que el comportament aberrant de les DCs pot ser intrínsec, pot ser resultat d'un ambient inflamatori o una combinació de tots dos esdeveniments. En concordança, les DCs obtingudes de sang perifèrica de pacients de LES i les seves Mo-DCs generades *in vitro* estan caracteritzades per una expressió incrementada de CD86, CD80, CD40 i MHC de classe II, així com una taxa incrementada de FcRs activadors en comparació amb les DCs de controls sans i una secreció incrementada de citocines pro-inflamatòries com IL-6, IL-8 i BAFF en

absència d'estímuls de maduració exògens. A més, aquestes alteracions han mostrat una rellevància funcional, dotant a aquestes cèl·lules d'una capacitat incrementada per estimular la proliferació i activació de cèl·lules T al·logèniques (161,342–347) i suggerint que aquestes alteracions en el fenotip i funció de les DCs podrien induir i promoure, al menys en part, una activació anòmala de les cèl·lules T. De fet, la interacció entre les cèl·lules T, cèl·lules B i les DCs juga un rol central en la patogènesi del LES, conduint a una pèrdua de tolerància i a una autoimmunitat policlonal aberrant, que ajuda a iniciar i mantenir la resposta autoimmunitària.

En el desenvolupament de la CU s'han observat esdeveniments similars. En condicions homeostàtiques, els colonòcits reconeixen els productes bacterians a través dels PRRs expressats en la membrana apical i secreten senyals inhibidores com àcid retinoic i TGF- β que assegurin el manteniment d'un fenotip immadur/tolerogènic de les DCs intestinals que a més, expressen uns nivells reduïts de TLR2 i TLR4 respecte les d'altres teixits per limitar la seva capacitat per reconèixer antígens bacterians, un factor clau en la prevenció dels processos inflamatoris intestinals en absència de patògens invasors. Per contra, quan la integritat de les unions estretes resulta afectada, aquests bacteris travessen l'epiteli i són reconeguts pels PRRs localitzats en la membrana basolateral. En aquestes condicions, es produeix un bloqueig de les senyals inhibidores i les DCs desencadenen la resposta immunogènica. A la vegada, la presència de mediadors pro-inflamatoris plasmàtics modula l'arribada de DCs circulants cap als teixits amb unes característiques fenotípiques d'activació, alterant la resposta immunitària cap als bacteris entèrics (348). De fet, les DCs dels teixits inflamats en els pacients de CU presenten una expressió incrementada de TLR2 i TLR4, el que confereix a aquestes cèl·lules una capacitat incrementada per reconèixer antígens microbians i d'exacerbació de la resposta immunitària, perdent el seu perfil tolerogènic i mostrant un fenotip pro-inflamatori (349,350), un fenomen que també s'ha observat en el model murí de CU induïda per DSS (351). Aquests pacients també presenten una quantitat inferior de DCs circulants en comparació amb els controls sans (352) mentre que en la mucosa s'observen DCs CD83⁺ localitzades en les àrees del colon inflamades. Tanmateix, les DCs circulants i residents en la làmina pròpia

mostren una expressió incrementada de CD83, CD86 i CD40 en comparació amb les DCs de controls sans i aquestes DCs procedents de sang perifèrica i les Mo-DCs generades *in vitro* d'aquest pacients mostren una habilitat incrementada per induir la proliferació de cèl·lules T al·logèniques en co-cultiu (353,354), suggerint que poden tenir un rol important en la inducció d'aquesta resposta immunitària exacerbada i d'un ambient inflamatori en la CU.

Així, en ambdues malalties, tot i que els mecanismes que condueixen a la disrupció de la tolerància immunològica no han estat desxifrats, està clar que una tolerogenicitat alterada en les DCs, que condueix a la inducció de la resposta mediada per les cèl·lules T, està associada amb l'etiopatogènesi, la progressió i la perpetuació d'aquests processos autoimmunitaris i inflamatoris (355). En aquest sentit, el restabliment de la tolerància immunogènica a través de la modulació de les DCs en aquestes malalties resulta un objectiu coherent.

Els models murins utilitzats en estudis pre-clínic són rellevants per avaluar les implicacions terapèutiques de la inducció d'immunomodulació en les DCs ja que els diferents subtipus de DCs murines i humanes presenten una gran homologia. Així, en ratolins, els llinatges cel·lulars de DCs també involucren les cDCs residents dels teixits, pDCs i Mo-DCs que s'originen després d'un procés infecció o en processos experimentals immune-inflamatoris (356,357). A més, en els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral, el ratolí constitueix un bon model per avaluar l'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) donat que la proteïna C4BP murina no presenta cadena β (358) ni 2 dominis CCP de la cadena α , homòlegs al CCP5 i CCP6 de la cadena α de la proteïna C4BP humana (103). Així, donat que l'activitat immunomoduladora de la proteïna humana C4BP(β -) està atribuïda al domini CCP6 (94), aquesta activitat no interfereix amb l'activitat de la proteïna C4BP endògena murina.

El benefici potencial del tractament amb C4BP(β -) humana *in vivo* s'havia reportat prèviament en un model murí d'artritis autoimmunitària, atribuïble llavors exclusivament a la seva funció inhibidora del complement (304), donat que l'activació inapropiada del

El sistema de complement ha estat àmpliament proposada com a causa del dany tissular en les malalties autoimmunitàries i inflamatòries. Contràriament a aquesta idea, mostrava que C4BP(β^-) s'eliminava ràpidament de la circulació i que només afectava a l'activitat del complement de forma moderada, però amb un efecte terapèutic notable sobre el desenvolupament de l'artritis en els models utilitzats, suggerint un mecanisme d'acció alternatiu a la seva funció ben caracteritzada com inhibidor del complement.

5.1 Potencial terapèutic de C4BP(β^-) en els models murins de NL i CU

En el primer estudi realitzat en aquesta tesi doctoral sobre l'avaluació del potencial terapèutic de C4BP(β^-) s'ha mostrat l'eficàcia d'aquest tractament en dos models de **NL autoimmunitària espontània**: NZBW F1 i MRL-lpr. En primer lloc, s'ha comprovat que la proteïna C4BP(β^-) humana té capacitat per modular el comportament de les BM-DCs murines, prevenint la sobre-expressió de les molècules co-estimuladores CD80 i CD86 quan les cèl·lules són estimulades per a la seva maduració amb gardiquimod. El gardiquimod és una imidazoquinolina agonista de TLR7, un sensor innat endosomal de ssRNA que presenta un paper clau en el desenvolupament del LES i la NL (359–361). De fet, durant la progressió de la malaltia s'observa un increment de monòcits circulants que expressen alts nivells de TLR7 i que juguen un rol patogènic important en el dany glomerular. El seu bloqueig amb anticossos monoclonals anti-TLR7 bloqueja la infiltració d'aquests monòcits en la circulació, la melsa i els glomèruls renals, prevenint el desenvolupament de NL en els ratolins NZBW F1 (362). Tanmateix, en diferents models murins de LES, el tractament bloquejant de CD80 i CD86 abans del desenvolupament de la malaltia, inhibeix la producció d'autoanticossos, el desenvolupament de NL i millora de forma significativa la supervivència i la severitat de la malaltia (363,364).

En relació al mecanisme d'acció de C4BP(β^-), es mostra que la isoforma majoritària de C4BP, C4BP(β^+), amb la mateixa activitat inhibidora del complement que C4BP(β^-), però sense activitat immunomoduladora (94), no modifica la progressió de la NL en els ratolins NZBW F1. A més, C4BP(β^-), però no C4BP(β^+), mostra capacitat per

prevenir en aquests ratolins la progressió cap a la hipocomplementèmia, un marcador important de la presència dels ICs que es desenvolupen de forma característica en aquesta malaltia. Independentment però, s'ha demostrat que els nivells dels components del sistema de complement en la circulació cauen significativament a mesura que avança la malaltia renal, de forma concomitant amb l'aparició d'autoanticossos anti-dsDNA en sèrum, la formació i el dipòsit d'ICs en els glomèruls renals, que en ser opsonitzats per C3 consumeixen els components activats del complement circulants (365). Malgrat això, hem vist com l'activitat de C4BP(β -) limita tant el dipòsit de C3 en els glomèruls com la presència de C5/C5a en el teixit renal en els ratolins NZBW F1. De fet, la inhibició de l'activitat del complement en diferents punts, com ara amb anticossos monoclonals que bloquegen C5 (366), amb antagonistes dels receptors de C3a (367) o de C5a (368), o mitjançant inhibidors dirigits contra el receptor CR2, com ara CR2-DAF (369), CR2-Crry (370) o CR2-FH (371), han estat útils en el tractament de la NL, malgrat que evitar el dipòsit d'ICs o del complement sobre els glomèruls no sembla suficient per prevenir el desenvolupament de la malaltia renal (372–374). En aquesta línia, tot i que el tractament amb CYP, un immunosupressor d'ampli espectre utilitzat com a tractament estàndard per a les manifestacions més severes del LES (375), indueix una *downregulació* transcripcional de diferents efectors del complement en el teixit renal dels ratolins NZBW F1, no es va observar aquesta modulació amb el tractament amb C4BP(β -) però l'eficàcia terapèutica de C4BP(β -) era comparable amb la del tractament amb CYP. A més, disminuint 10 vegades la dosi subcutània de C4BP(β -) fins a 50 μ g/ratolí i realitzant una administració bisetmanal, la severitat de la malaltia disminuïa de forma significativa en els ratolins amb NL.

La regulació exercida per C4BP(β -) sobre Mo-DCs contraresta de forma directa l'activació immune-inflamatòria cel·lular mitjançant la inducció d'un estat anti-inflamatori i tolerogènic en Mo-DCs que presenten una activitat reguladora sobre múltiples subtipus de cèl·lules mieloides i limfoides, pel que han sigut objectiu d'alguns tractaments per la NL (376). En concordança, en la patogènesi del LES, les cèl·lules mieloides semblen jugar un rol central a diferents nivells. De forma més immediata degut a la incapacitat dels fagòcits per aclarir cèl·lules i cossos apoptòtics així com els ICs formats per autoantígens i autoanticossos IgG. En aquest nivell d'actuació,

Discussió

l'administració de C4BP(β -) en el model NZBW F1 amb NL evita l'acumulació de cèl·lules apoptòtiques a nivell glomerular i intersticial i/o de cossos apoptòtics, prevenint la mort cel·lular o bé incrementant el seu aclariment en el ronyó i disminuint l'acumulació d'IgG en el còrtex renal.

A nivell molecular, l'anàlisi comparatiu del perfil transcripcional del teixit renal dels ratolins NZBW F1 de 36 setmanes d'edat va revelar una gran especificitat del tractament amb C4BP(β -) respecte el tractament convencional amb CYP. Així, establint com a llindar un $FC \geq 1.8$, només 24 transcrits (un 6.4% dels gens relacionats amb el LES inclosos en l'*array*) es trobaven regulats per C4BP(β -) comparat amb els 224 transcrits (un 59.4% dels gens relacionats amb el LES inclosos en l'*array*) que es trobaven regulats per CYP, malgrat que ambdós tractaments conferien millores funcionals anàlogues en els ronyons nefrítics dels ratolins NZBW F1. Això evidencia un perfil de seguretat incrementat, degut a una acció més focalitzada i específica de la immunomodulació mediada per C4BP(β -) en comparació amb la toxicitat coneguda de la immunosupressió global que té lloc amb el tractament amb CYP. Aquest perfil transcripcional, resultant del tractament amb C4BP(β -) va revelar una expressió menor de marcadors típics de cèl·lules immunitàries, amb una reducció significativa dels transcrits característics de cèl·lules B (*Cd19*, *Ms4a1* (*Cd20*) i *Tnfrsf13c* (*BAFFR*)), cèl·lules T (*Lat*) i neutròfils (*Prtn3*, *S100a8* i *S100a9*) identificant els infiltrats de cèl·lules inflamatòries en el parènquima renal en els ronyons dels ratolins NZBW F1 nefrítics no tractats. Cal destacar que l'expressió de l'alarmina calprotectina (*S100a8/S100a9*), que exclusivament es mostrava disminuïda pel tractament amb C4BP(β -) indueix l'activació de l'inflamasoma, monocitosi i neutrofilia dependents d'IL-1 β (377). En concordança, s'ha mostrat recentment que C4BP inhibeix la secreció local d'IL-1 β i l'activació de l'inflamasoma induïda pel polipèptid amiloide dels illots pancreàtics (378). De fet, la reducció o absència de cèl·lules tant mieloides com limfoides en els ronyons dels ratolins tractats amb C4BP(β -) es veu recolzada per l'avaluació immunohistoquímica i posa de manifest que la immunomodulació mediada per C4BP(β -) té com a diana efectors cel·lulars responsables de la desregulació immunitària que condueix al LES (379). A més, els anàlisis experimentals i

bioinformàtics emfatitzen la inhibició de les vies pro-inflamatòries d'NF- κ B i de la via d'Irf7 a través de l'acció de C4BP(β -), conduint a la supressió de la resposta immunitària innata. L'activació de TLR7 i TLR9 promou la fosforilació i la translocació d'Irf7, que forma un complex amb Myd88 resultant en la producció de IFN- α (380) i en els ratolins deficients per Irf7, els monòcits i DCs inflamatòries reclutades en els teixits poden produir citocines inflamatòries involucrades en el dany tissular però no tenen capacitat per produir IFN- α . Tanmateix en aquests ratolins no es produeixen anticossos anti-ssDNA, dsDNA, Sm i RNP (381), mentre que la via d'NF- κ B regula la transcripció de gens que codifiquen per citocines i quimiocines; pel que ambdues vies estan considerades essencials en la producció d'autoanticossos i el desenvolupament de la NL murina (382).

L'estat inflamatori crònic que té lloc en la NL afavoreix el desenvolupament d'ELS, un marcador tissular d'autoimmunitat, amb l'objectiu de gestionar l'elevada concentració local d'autoantígens mitjançant la formació d'una xarxa de fDCs, que realitzen la presentació antigènica, envoltades d'àrees de cèl·lules B i cèl·lules T organitzades de forma similar als CGs dels òrgans limfoides secundaris (383). La distribució d'aquests tipus cel·lulars dins dels CGs és essencial pel desenvolupament d'una resposta efectiva i està estretament regulada per l'expressió de molècules d'adhesió, receptors de quimiocines i de citocines de l'ambient. En les cèl·lules B i les cèl·lules Thf aquesta organització està orquestrada principalment per l'expressió del receptor CXCR5, que indueix l'atracció d'aquestes cèl·lules cap a la quimiocina CXCL13, produïda en els CGs per les fDCs. Així, s'ha vist que tant en el model NZBW F1 com en els pacients de NL, la quimiocina CXCL13 juga un rol important en l'inici i desenvolupament de la NL (384,385) i que uns nivells sèrics patològicament incrementats de CXCL13 indueixen la quimiotaxi de cèl·lules B i cèl·lules T activades que expressen en la superfície CXCR5, cap al teixit renal, estimulants la formació d'ELS (386). Tanmateix, BAFF pot incrementar la quimiotaxi de cèl·lules B de memòria en resposta a CXCL13. Així, la sinèrgia entre CXCL13 i BAFF produïdes per les fDCs presenta importants implicacions en l'homeòstasi de cèl·lules B, el desenvolupament d'àrees de cèl·lules B i la formació d'ELS que s'observa en aquesta i altres malalties autoimmunitàries (167).

Tanmateix, s'ha mostrat que un bloqueig de CXCL13, provoca una disrupció en la formació d'ELS (387) i atenua la NL en el model de ratolí MRL-lpr (388). Els resultats presentats, mostren que el tractament amb C4BP(β -) condueix cap a una *downregulació* de CXCL13, tant sistèmica i com local, en el model NZBW F1. En conseqüència, hi ha una absència d'ELS corticals en els ratolins tractats amb C4BP(β -) d'ambdós models NZBW F1 i MRL-lpr, de forma consistent amb la reducció dels infiltrats de cèl·lules immunitàries inflamatòries en comparació amb el teixit dels ratolins nefrítics no tractats. Les fDCs estan considerades les principals productores de CXCL13, tot i que els monòcits, macròfags i les DCs mieloides que es van reclutant en el procés de la malaltia també semblen secretar CXCL13 en resposta a l'activació per lligands de TLR2 i TLR4 (389–393). Així, l'acció de C4BP(β -) a través de l'eix cèl·lula mioide-CXCL13-ELS podria prevenir la neogènesi d'ELS en els teixits amb inflamació crònica, que correlaciona amb el rebuig d'al·loempelts i la progressió de diferents malalties autoimmunitàries (394).

En el segon estudi *in vivo* es va avaluar l'eficàcia de C4BP(β -) en el **model murí de CU aguda induïda per DSS**. En l'estudi presentat, el tractament amb C4BP(β -) presenta un efecte protector, atenuant la pèrdua de pes, reflectida en l'avaluació diària de l'activitat de la malaltia, i a final de l'estudi, alleujant l'escurçament del colon i l'estat inflamatori a nivell macroscòpic. A nivell histològic, C4BP(β -) preserva l'estructura de la capa mucosa intestinal a nivell del colon distal, mentre que els ratolins que no van rebre tractament evidencien les característiques del dany químic induït pel DSS sobre la monocapa epitelial que recobreix l'intestí, que resulta en la pèrdua de les cèl·lules epitelials i la subseqüent exposició de la làmina pròpia als antígens luminals i a la microbiota, desencadenant la disseminació dels continguts intestinals pro-inflamatoris (bacteris i productes bacterians) al teixit subjacent (395,396) que s'evidencia per l'expressió alterada de les proteïnes essencials que conformen les unions estretes, claudina-1, ocludina i ZO-1. Aquesta alteració, inicialment produïda per l'estimulació de LPS en les cèl·lules epitelials, és el desencadenant de la disfunció de la barrera mucosa intestinal i és crucial en el desenvolupament de la CU. De fet, la pèrdua d'expressió i funció d'aquestes proteïnes està associada amb la seva severitat, pel que

la seva modulació és la diana per tota una sèrie de teràpies novells i tractaments profilàctics (397). En aquest sentit, C4BP(β -) preserva l'expressió de les proteïnes de les unions estretes mantenint la integritat de la barrera mucosa intestinal, que junt amb la consegüent prevenció de la infiltració inflamatòria han estat àmpliament validades en nombrosos estudis com a signes de protecció davant la inducció de CU per DSS en els models murins (398–400).

De forma rellevant, C4BP(β -) mitiga la pèrdua d'expressió del transcrit *Ppar γ* , que es mostra disminuïda en el teixit intestinal dels ratolins amb CU induïda per DSS que no van rebre tractament i també s'ha observat aquesta alteració en els colonòcits dels pacients de CU. L'expressió disminuïda de *Ppar γ* junt amb l'evident sobre-expressió de TLR4 en les cèl·lules epitelials condueix a una pèrdua de tolerància cap a LPS luminal (327) amb la consegüent producció exacerbada de mediadors inflamatoris que resulten en dany en la mucosa (401). *Ppar γ* és un receptor nuclear que modula negativament NF- κ B, de manera que la transcripció de les vies dependents de *Ppar γ* redueixen la inflamació intestinal en els ratolins amb CU, ja que estan relacionades amb una disminució de la producció de citocines pro-inflamatòries com TNF- α , IL-1 β i IL-6, quimiocines en el teixit intestinal com CXCL1, CXCL2, i CXCL3 i l'expressió d'algunes molècules d'adhesió (328) disminuint el reclutament de cèl·lules inflamatòries i la inducció de la resposta inflamatòria per part de LPS o TNF- α . Tanmateix, l'administració d'agonistes de *Ppar γ* disminueix la inflamació en el colon (402) evidenciant que el manteniment de l'expressió d'aquest transcrit per part de C4BP(β -) controla, en última instància, les activitats cel·lulars.

En conjunt, la disfunció de l'epiteli, influenciada per aquests factors, té com a conseqüència una permeabilitat incrementada, l'entrada de bacteris en la làmina pròpia i l'activació de TLR4 en les cèl·lules immunitàries innates de la mucosa, principalment neutròfils, macròfags i DCs, que secreten TNF- α , IL-1 β i IL-6. En aquesta etapa, les DCs semblen jugar un rol central en la resposta de l'hoste cap a la microbiota intestinal tant en la resposta innata com en la caracterització de la resposta adaptativa posterior. La integritat epitelial alterada és concurrent amb l'increment de TNF- α en el colon dels ratolins del grup DSS. TNF- α es troba incrementada en la mucosa intestinal,

en sèrum i en mostres de femta de pacients amb malalties inflamatòries intestinals. La seva secreció produeix una expansió de la inflamació local i sistèmica que indueix l'apoptosi de les cèl·lules epitelials intestinals; afegint un altre factor que contribueix a l'alteració de l'expressió de les proteïnes de les unions estretes (403) i les funcions de la barrera mucosa intestinal (404). Així, en forma de *feedback*, la pèrdua de la integritat epitelial precedeix el procés inflamatori però el procés inflamatori hi contribueix a través de la secreció de citocines que actuen directament sobre la integritat de la barrera epitelial. El bloqueig de TNF- α amb anticossos monoclonals com l'infliximab o l'adalimumab, ha sigut àmpliament validat com a tractament en la CU inhibint la inflamació en el colon (276,405). En aquest cercle, C4BP(β -) ha mostrat una reducció de l'expressió de TNF- α a nivell sistèmic, en correlació amb el manteniment de la integritat de la mucosa intestinal a nivell histològic.

La microbiota intestinal és la font més gran d'endotoxines, i el desencadenament de la permeabilitat intestinal amb la conseqüent translocació bacteriana és la principal causa d'endotoxèmia, caracteritzada per l'increment dels nivells sèrics de LPS, com s'observa en els ratolins amb CU. En pacients que experimenten un estat d'endotoxèmia, els nivells de IL-1ra circulants, produït per monòcits i neutròfils (406), s'incrementen 100 vegades més que els d'IL-1 β (407,408) com a mecanisme inductor de l'homeostàsi, per limitar els efectes deleteris d'IL-1 β . Aquest desequilibri entre IL-1 β i IL-1ra juga un rol crucial en les etapes inicials del desenvolupament de les malalties inflamatòries intestinals. En paral·lel, la presència d'endotoxines a nivell sistèmic i la secreció d'IL-6 desencadenen la producció d'haptoglobina, una proteïna de fase aguda produïda pels hepatòcits (409). La producció d'haptoglobina en el model de CU induïda per DSS correlaciona amb la puntuació inflamatòria macroscòpica (312,326) i antagonitza la resposta inflamatòria induïda, inhibint la producció de TNF- α , IL-10 i IL-12p70 en els monòcits i macròfags (410) i exercint una supressió de la funció limfocitària (411). En aquest nivell d'actuació de la resposta inflamatòria aguda, en els ratolins tractats amb C4BP(β -) s'observen uns nivells plasmàtics reduïts de IL-1ra i una disminució d'haptoglobina a nivell transcripcional d'acord amb l'absència d'endotoxina circulant.

Aquests mecanismes compensadors es desencadenen junt amb la “pluja” de citocines que caracteritza el procés inflamatori en els ratolins amb CU. En aquest sentit, una reducció dels nivells de citocines inflamatòries sèriques representa un objectiu lògic per a la teràpia de les malalties inflamatòries intestinals. En aquest sentit, a nivell sistèmic, la inducció de la CU va mostrar un perfil de mediadors inflamatoris relacionats amb la migració de neutròfils (C5/C5a, G-CSF, CXCL1(KC), CXCL2 (MIP-2), de monòcits inflamatoris (CCL1 i CCL2 (MCP-1) i cèl·lules mieloides i limfòcits T (CXCL10(IP-10)). Diversos estudis que han detallat el perfil de citocines característic de la CU en humans, especialment enfocats en marcadors sèrics, mostren similituds amb aquestes dades (333,412,413), la secreció dels quals es va mostrar mitigada pel tractament amb C4BP(β -). G-CSF pot ser produïda per tota una varietat de cèl·lules, incloent cèl·lules endotelials, fibroblasts, macròfags i monòcits en resposta a diferents mediadors inflamatoris com IL-1 β , IL-17, LPS i TNF- α (414) i estimula de la producció de neutròfils des de la medul·la òssia cap a la circulació. Tanmateix, en aquestes etapes inicials de la inflamació aguda, altres mediadors regulen la migració neutrofilica com ara C5a, que presenta un rol complex en la fase aguda de la malaltia evidenciada en nombrosos estudis amb la utilització d'anticossos neutralitzants o en ratolins sense receptor de C5a, on es veu disminuïda la infiltració intestinal de cèl·lules polimorfonuclears i un dany reduït en la mucosa (415,416). A més, en el desencadenament de la inflamació intestinal els monòcits/macròfags tissulars i els mastòcits estimulats per LPS, contribueixen al reclutament de neutròfils, guiant la seva extravasació, a través de la producció de les quimiocines CXCL1 (KC) i CXCL2 (MIP-2) (anomenada IL-8 o CXCL8 en humans) que interaccionen amb el seu receptor específic CXCR2 (417), i incrementen el temps de vida dels neutròfils secretant GM-CSF, G-CSF i TNF- α . El *knockout* de CXCR2 presenta una infiltració neutrofilica disminuïda en el model de CU induïda per DSS (418). Així, a través d'aquests mecanismes, els neutròfils presents en la circulació travessen l'endoteli vascular condicionats pel gradient quimioatrant fins arribar a la làmina pròpia intestinal (419). Un cop en el lloc d'inflamació els neutròfils incrementen la resposta inflamatòria reclutant monòcits inflamatoris que es diferenciaran a DCs i macròfags inflamatoris (420) a través de l'eix CCL2 (MCP-1)/CCR2 i un cop reclutats en les àrees inflamades

Discussió

secreten grans quantitats de citocines pro-inflamatòries com TNF- α , IL-1 β i IL-6. La disminució de l'expressió de CCL2/CCR2 millora els paràmetres en el model animal de CU induïda amb DSS (421).

Així, els neutròfils constitueixen la primera línia de defensa i contribueixen de forma significativa a la generació de dany tissular en els processos d'inflamació intestinal (422). A més, CXCL2 indueix la producció de MMP-9, permetent als neutròfils creuar la capa epitelial i fagocitar els patògens. La seva expressió crònica condueix a la pèrdua de la integritat estructural de la mucosa i és determinant en el dany tissular (423), i junt amb MMP-1, produïda per les cèl·lules intersticials activades, són els enzims més importants en la degradació de la matriu extracel·lular. L'activitat d'ambdues metal·loproteases està controlada pel seu inhibidor TIMP-1, l'expressió del qual es troba incrementada en les àrees d'inflamació i ulceratives de pacients de CU i correlaciona amb la severitat de la malaltia (332). L'increment local de TIMP-1 també s'ha associat amb fibrosi intestinal (424). Per aquest motiu, el reclutament de neutròfils afecta de forma directa a la disrupció de la barrera mucosa intestinal i C4BP(β -), inhibint el reclutament de neutròfils contribueix també, per aquesta via, al manteniment de la integritat de l'epiteli, de forma concordant amb l'expressió reduïda de TIMP-1 que mostren els ratolins tractats.

Addicionalment, C4BP(β -) disminueix la concentració sèrica de CXCL10 (IP-10), incrementada en els ratolins amb CU induïda per DSS, que també està incrementada en pacients amb CU. Aquesta quimiocina actua inhibint la proliferació de les cèl·lules epitelials de les criptes intestinals i disminuint la seva renovació, de manera que el seu bloqueig promou la supervivència de les criptes i protegeix el teixit de la formació d'úlceres en models *in vivo* (331). L'anticòs monoclonal anti-IP-10, el delumab, s'està avaluant en assajos clínics de fase II (425). Tanmateix, aquesta quimiocina també presenta un paper important en l'activació de l'expressió de les integrines, afavorint l'adhesió de monòcits i cèl·lules T a l'endoteli i mitjançant el seu transport a les àrees inflamades del colon.

L'expressió dels transcrits *Prtn3*, *S100a8* i *S100a9* característics dels neutròfils en teixit intestinal, i l'expressió de la proteïna S100a8/S100a9 va confirmar la presència aberrant de neutròfils a nivell local i la prevenció d'aquesta infiltració pel tractament amb C4BP(β -). S100a8/S100a9 modula la polimerització de la tubulina i el reordenament del citoesquelet, essencials en la migració de monòcits i neutròfils, pel que en els processos d'inflamació, l'expressió excessiva d'aquesta proteïna magnifica la resposta inflamatòria estimulando el reclutament d'aquestes cèl·lules, i estimula la secreció de citocines, induint un *feedback* que agreuja aquestes alteracions (426). El seu bloqueig ha mostrat potencial com a tractament en el desenvolupament de la CU i el càncer de colon associat (427). De fet, la calprotectina fecal és el biomarcador predictiu més utilitzat en la pràctica clínica en les malalties inflamatòries intestinals degut a la seva alta correlació amb les mètriques d'avaluació de l'activitat de la malaltia a nivell endoscòpic i histopatològic, i en el risc de recaiguda (428–430).

Aquesta complexitat de la xarxa contínua de citocines i quimiocines inflamatòries en la mucosa intestinal que té lloc en la CU destaca les principals limitacions de les estratègies terapèutiques dirigides a una única diana.

En aquest estudi, l'avaluació de les poblacions mieloides infiltrades en la làmina pròpia en els ratolins amb CU va revelar la presència de monòcits/macròfags (F4/80⁺) i DCs (CD11c⁺) en el colon distal, un *hallmark* histològic característic de la CU activa. Tanmateix, C4BP(β -) va inhibir el reclutament d'aquestes cèl·lules immunitàries innates i de cèl·lules B (BAFFR⁺). En concordança, la sobre-expressió de CXCL13 en el grup de ratolins amb CU induïda per DSS en sèrum i teixit intestinal, disminuïda en els ratolins tractats amb C4BP(β -) va posar de manifest la formació d'ELS, tot i que a nivell histològic no es va evidenciar, probablement pel caràcter agut d'aquest model. Aquesta quimiocina junt amb l'expressió del seu receptor CXCR5 juga un rol important en la formació normal del GALT, però la seva expressió incrementada, atrau limfòcits B per a la formació d'ELS que es localitzen entre les criptes i la capa muscular de la mucosa en zones ulceratives i al voltant de vasos limfàtics (431,432) i suggereixen la transformació de les lesions agudes cap a un estat crònic (334). Aquests fol·licles limfoides aïllats, de forma anàloga als que hem observat en els models animals de NL,

estan involucrats en la presentació antigènica i el desenvolupament d'una resposta immunitària adaptativa eficient, i en la CU la seva presència, així com el nombre i mida d'aquests es van incrementant en relació amb el grau de dany epitelial, indicant una etapa final perjudicial en el desenvolupament de la desregulació immunitària intestinal i la pèrdua de tolerància.

5.2 Dissecció i caracterització de l'activitat immunomoduladora de C4BP(β -) i avaluació del potencial terapèutic de PRP6-HO7

En aquest estudi s'ha confirmat que C4BP(β -) és una proteïna estructuralment modular també proveïda d'una modularitat funcional dual. Així, mentre que els dominis CCP1-CCP3 són requerits per a l'activitat canònica com a inhibidor del complement, el domini CCP6 és responsable de la seva activitat no canònica anti-inflamatòria i tolerogènica. Per contra, C4BP(β +), fins i tot quan es troba desproveïda de PS, no presenta aquesta activitat no canònica. A més, s'ha mostrat que el domini CCP6 no només és necessari, si no també suficient, i que la seva oligomerització és indispensable, per a l'activitat no canònica immunomoduladora de C4BP(β -). PRP6-HO7 és un heptàmer recombinant resultant de la unió de CCP6 amb el domini d'oligomerització de C4BP que no presenta l'activitat inhibidora del complement de C4BP mentre que preserva de forma completa la seva activitat immunomoduladora en la inducció d'un fenotip semi-madur i tolerogènic en Mo-DCs, de manera anàloga a C4BP(β -). Tanmateix, hem evidenciat el potencial terapèutic de l'activitat no canònica de C4BP(β -) per limitar el desenvolupament de la NL en dos models animals i la cascada inflamatòria que caracteritza la CU. Continuant amb l'estudi d'aquest potencial terapèutic hem revelat que PRP6-HO7 induïx un fenotip anti-inflamatori en monòcits aïllats de pacients amb NL autoimmunitària i mitiga els trets patològics més immediats del model de CU aguda induïda amb DSS, confirmant la seva eficàcia anàloga a C4BP(β -) en aquests processos immune-inflamatoris.

C4BP presenta rols ben definits dins del sistema de complement com a cofactor per a la inactivació de C4b mediada pel FI i promovent el decaïment de la C3 convertasa

(433). Addicionalment, la seva isoforma majoritària, la proteïna hetero-oligomèrica C4BP(β +), unida a PS a través de la seva cadena β , interacciona amb cèl·lules apoptòtiques promovent el seu aclariment silent, contribuint així a l'homeòstasi cel·lular i tissular mitjançant la prevenció d'una inflamació innecessària (434). Malgrat que totes les molècules circulants de C4BP(β +) es troben unides a PS, inhibint la seva funció anticoagulant, hem revelat que la cadena β de C4BP, sense la necessitat de tenir unida PS, és la responsable de l'absència d'activitat immunomoduladora en C4BP(β +).

La proteïna oligomèrica C4BP està formada per dominis CCP o sushi, d'uns 60 aminoàcids, alineats formant les cadenes α i β , amb el CCP8 als extrems C-terminals de les 7 cadenes α i el CCP3 a l'extrem C-terminal de la cadena β , units entre ells pel domini d'oligomerització (102,435). La modularitat de C4BP, donada per la seva composició en dominis CCP, dota a les diferents isoformes de flexibilitat per interaccionar amb C4b, tot i que cada molècula de C4BP només pot unir quatre molècules de C4b degut a impediments estèrics (111). De forma anàloga, la flexibilitat limitada del domini intern CCP6 de la cadena α i la presència de la cadena β probablement impedeix que C4BP(β +), interaccioni de forma òptima amb el(s) receptor(s) corresponent(s) en la superfície dels fagòcits, amagant l'activitat immunomoduladora evidenciada en C4BP(β -). Per exemple, en la interacció de CRP amb C4BP, es va observar que C4BP havia de presentar una estructura oligomèrica i que aquesta interacció tenia lloc per la seva part central, on les subunitats α conflueixen. Tanmateix, es va comprovar que CRP s'unia de forma dèbil a C4BP(β +) sense PS i la unió amb la forma completa C4BP(β +)–PS, encara presentava una unió més dèbil degut a impediments estèrics, mentre que CRP i C4BP(β -), ambdues incrementades després d'un procés inflamatori, s'unien amb gran afinitat (115).

Aquesta modularitat de C4BP(β -) també permet exercir ambdues activitats, l'activitat canònica inhibidora del complement i no canònica com a immunomodulador, de forma independent. En aquesta línia, la variant PRP5/8-HO7, desproveïda per deleció dels dominis N-terminals CCP1-CCP4 de la cadena α , crítics per a la unió de C4b i C3b i per tant, de la inhibició del complement (433), retenia l'activitat no canònica immunomoduladora sobre les Mo-DCs. A més, PRP6-HO7, la variant recombinant més

petita, sintetitzada per unió del domini immunomodulador CCP6 de la cadena α amb el domini d'oligomerització de C4BP, va mostrar que aquesta estructura era necessària i també suficient per conferir una activitat immunomoduladora completa, sent desproveïda de la seva activitat canònica inhibidora del complement i també de la unió a patògens que condueix, en detriment de l'hoste, a l'evasió del sistema de complement. Certament, el reclutament de la proteïna C4BP humana en les superfícies de bacteris Gram-positius i Gram-negatius, virus i fongs ha estat àmpliament descrita (434,436), fent que l'hoste esdevingui més susceptible a episodis d'infecció (437). També s'ha demostrat que el domini CCP6 de la cadena α de C4BP necessita oligomeritzar, de forma anàloga com ho fa C4BP(β -), per preservar la seva funció immunomoduladora completament. Aquesta estructura multivalent, que recorda a les molècules d'immunoglobulina, probablement interaccioni amb gran avidesa amb un receptor multivalent o un clúster de receptors monovalents. Així, encara que el(s) immunoreceptor(s) responsable(s) d'aquesta activitat immunomoduladora de C4BP(β -) i PRP6-HO7 encara estan sent identificats, la interacció en Mo-DCs que estan sent diferenciades és cooperativa i de gran afinitat (resultats no publicats). En efecte, l'estructura oligomèrica d'ambdues proteïnes, C4BP(β -) i PRP6-HO7, suggereix que la inducció d'un clúster de receptors podria incrementar la seva força per a la senyalització. De fet, el domini d'oligomerització de C4BP proporciona la distància òptima entre els diferents dominis d'unió a proteïnes per maximitzar l'afinitat d'unió a receptors diana multimèrics mitjançant interaccions multivalents (438,439) i, en conseqüència, també s'ha aprofitat per augmentar el rendiment d'anticossos recombinants (440), receptors vírics solubles (441), pèptids inductors d'apoptosi (442) o immunoconjugats hetero-multimèrics basats en FHR4 que activen de forma selectiva la via alternativa del complement en cèl·lules tumorals (443).

En comparació amb C4BP(β -), la proteïna oligomèrica PRP6-HO7 presenta una mida petita (100 kDa) i la seva estructura simètrica i compacta probablement proporciona estabilitat termodinàmica i impacta positivament en el seu temps de vida mitja *in vivo*. S'ha mostrat que les proteïnes compostes per dominis CCP, i particularment C4BP,

mantenen una estabilitat funcional i estructural remarcables després de ser exposades a condicions desfavorables extremes (444). A més, la regió d'hèlix α completa, que constitueix el domini d'oligomerització, és necessari per a la formació de polímers estables, que són estabilitzats per la formació d'enllaços disulfur intermoleculars i per interaccions electroestàtiques (98,316).

De forma anàloga a C4BP(β -) (94), PRP6-HO7 mostra una activitat immunomoduladora equivalent sobre Mo-DCs, un model *in vitro* de DCs inflamatòries àmpliament establert (445), sota condicions semblants a les que trobem en la circulació (50% de sèrum humà). A més, PRP6-HO7 té la capacitat de disminuir l'expressió del marcador de maduració i el *checkpoint* immunològic CD83 (446) i de les molècules co-estimuladores CD80, CD86 i CD40, i MHC, i de limitar la secreció de citocines pro-inflamatòries malgrat ser estimulades amb un estímul pro-inflamatori. Addicionalment, les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7 presenten una capacitat endocítica incrementada, una reducció en l'expressió de CCR7 i de la seva capacitat quimiotàctica i una disminució en l'estimulació de la proliferació de les cèl·lules T al·logèniques en co-cultiu i de la producció d'INF- γ . Aquests resultats concorden amb les característiques típiques de les DCs tolerogèniques o reguladores, que mantenen un fenotip semi-madur caracteritzat per la inducció d'anergia clonal de les cèl·lules T i/o modulació metabòlica en les cèl·lules T i producció de citocines anti-inflamatòries que condueixen a la supressió de l'activitat efectora de les cèl·lules T i estimulen la diferenciació de cèl·lules Treg (125,447,448). És d'interès que les Mo-DCs "reprogramades" pel tractament amb PRP6-HO7 eviten la sobre-expressió dels marcadors d'activació, de les molècules co-estimuladores i d'HLA-DR, independentment de l'agonista de TLR utilitzat, suggerint que PRP6-HO7 és efectiu davant de tot el ventall de PAMPs i DAMPs, modulant les vies comunes dependents de MyD88 i TRIF (449,450) i mantenint aquest fenotip estable davant de tot un rang d'estímuls de maduració.

Després de demostrar el potencial terapèutic de C4BP(β -) en dos models murins de NL autoimmunitària, on s'ha mostrat que impedeix la successió d'esdeveniments que condueixen a la malaltia i la infiltració cel·lular immunitària pro-inflamatòria, en aquest

Discussió

estudi es va ampliar la seva aplicació a Mo-DCs i Mo-macròfags obtinguts d'una cohort reduïda de pacients de LES amb la malaltia en estat actiu i involucració renal. Així, s'ha demostrat que ambdues C4BP(β -) i PRP6-HO7 eviten de forma significativa la sobre-expressió de CD83 i de les molècules co-estimuladores (CD86, CD80 i CD40) i la producció de citocines pro-inflamatòries (TNF- α , IL-12) en aquestes Mo-DCs estimulades amb LPS i, particularment, amb gardiquimod, agonista de TLR7, que com hem comentat prèviament, és clau en el desenvolupament del LES i la NL, presentant un rol central en inflamació, pèrdua de tolerància i producció d'IFN de tipus I.

Pel que fa a l'avaluació de l'eficàcia del tractament en condicions basals, en Mo-macròfags M0, PRP6-HO7 mostra la capacitat de disminuir el nivell d'expressió del receptor de superfície cel·lular CD64. L'expressió de CD64 (Fc γ RI) és induïble per IFN- α i esdevé un biomarcador que reflecteix els nivells d'IFN- α , el procés inflamatori i el grau de nefritis en el LES (451–454), de manera que un increment de la seva expressió en monòcits circulants reflecteix el nivell sistèmic d'inflamació i l'activitat de la malaltia renal (453). El reconeixement dels ICs en el LES produeix una activació mediada per Fc γ RI dels sensors innats de DCs i macròfags, que sembla tenir lloc de forma prèvia a la secreció d'IFN- α , de BAFF, de l'expansió de cèl·lules B i de la progressió cap a la NL (323) i resulta suficient per iniciar la resposta inflamatòria en presència de dipòsits d'ICs glomerulars en els ratolins NZBW F1, mentre que l'absència dels Fc γ Rs els protegeix de la NL (374). La inhibició de Fc γ RI en els macròfags renals de ratolins MRL-lpr produeix una disminució dels nivells de proteïnúria i d'autoanticossos anti-dsDNA, una reducció de les citocines inflamatòries a nivell renal (IL-1 β i IL-18) i disminueix la resposta inflamatòria renal a través de la senyalització associada a l'inflamasoma via NLRP3 (452).

A més, en les Mo-DCs immadures, el tractament amb PRP6-HO7 va disminuir els nivells basals intrínsecs d'expressió de CD83, CD86, CD80, CD40 i HLA-DR. Estudis previs han posat de manifest que aquestes diferències fenotípiques (en l'expressió d'aquests marcadors) correlacionen amb algunes manifestacions clíniques i serològiques de la malaltia, indicant que les anomalies observades en les DCs en el LES no són un mer resultat de la malaltia activa, si no que poden tenir una significança

patogènica. Per exemple, la capacitat de les DCs per induir la proliferació de cèl·lules T correlaciona amb l'SLEDAI (161) i els nivells d'expressió dels marcadors de superfície correlacionen amb la severitat de la malaltia (342). En aquest estudi, hem observat que aquests marcadors de cèl·lules mieloides correlacionen quantitativament amb els paràmetres sèrics més rellevants que defineixen l'activitat i severitat de la NL (components del complement, immunoglobulines, cèl·lules immunitàries i proteïnes com la creatinina, albúmina i ferritina, i amb el filtrat glomerular). En l'escala clínica, la deposició del complement en el teixit renal s'ha proposat com a predictor de la insuficiència renal en pacients amb NL (455). A més, la presència d'autoanticossos i l'acumulació patogènica d'ICs en els diversos teixits també actuen com a *hallmarks* de la malaltia (174,456). Tots aquests esdeveniments resulten en un esgotament dels components circulants del complement i en hipogammaglobulinèmia, excepte per IgM, que s'uneix preferentment a autoantígens circulants com ara dsDNA. Sorprenentment, tot i que els pacients inclosos en l'estudi es trobaven amb una pauta farmacològica (hidroxicloroquina, corticoides i/o immunosupressors), aquests tractaments sembla que no van influenciar l'eficàcia immunomoduladora de PRP6-HO7, probablement degut al seu mecanisme d'acció distintiu.

Per últim, es va realitzar un estudi preliminar *in vivo* per a l'avaluació del potencial terapèutic de PRP6-HO7 en el model animal de CU induïda per DSS. El bloqueig de les molècules co-estimuladores en BM-DCs murines ha mostrat evitar el desenvolupament de CU induïda per DSS en ratolins (457). En aquest treball, de forma anàloga als resultats obtinguts amb el tractament amb C4BP(β -), el tractament amb PRP6-HO7 va preservar, a nivell histològic, la capa superficial de cèl·lules epitelials prevenint l'erosió mostrada en els ratolins amb CU, les poblacions cel·lulars i l'estructura de les criptes, mitigant els canvis histopatològics i el tret patològic macroscòpic característic de la CU.

5.3 C4BP(β -) i PRP6-HO7 com a inductors de tolerogènesi en Mo-DCs per al tractament de malalties immune-inflamatòries

En l'actualitat, la immunosupressió farmacològica és crucial en l'estratègia terapèutica per reduir la inflamació i inhibir la resposta immunitària en el LES i la CU. Aquests règims de tractament convencionals amb altes dosis de corticoesteroides i immunosupressors, han estat utilitzats àmpliament en el tractament d'aquestes malalties però presenten nombrosos i, de vegades, severos efectes adversos per la seva baixa especificitat i un risc incrementat d'infeccions com a conseqüència de la supressió generalitzada del sistema immunitari en l'hoste. Tanmateix, malgrat els nous tractaments biològics, hi ha pacients resistents que desenvolupen manifestacions clíniques que suposen un risc per la vida, com la NL. Per aquest motiu, són necessaris nous agents terapèutics que presentin una efectivitat, selectivitat i perfil de seguretat incrementats.

Les DCs han esdevingut una diana terapèutica en aquestes patologies inflamatòries i autoimmunitàries degut al seu rol crucial en la desregulació immunitària i la seva contribució a la iniciació, progressió i perpetuació de la patogenicitat, però també per la seva plasticitat en l'adquisició de funcions inductores de tolerància. Així, les estratègies terapèutiques dirigides a promoure la presentació antigènica en un context tolerogènic per generar un microambient supressor que contribueixi al restabliment de la tolerància perifèrica en les cèl·lules T auto-reactives i les cèl·lules B productores d'anticossos, han esdevingut una opció prometedora. De fet, la modulació de l'activitat de les DCs, com organitzadores centrals de la resposta per part d'altres cèl·lules immunitàries, amb l'objectiu de controlar les respostes inflamatòries exacerbades i perjudicials i restituir la tolerància, deixant intacta la immunitat protectora contra patògens i tumors, s'està convertint gradualment en una realitat en la clínica.

En concordança, a més de ser explorades en models animals experimentals de malalties autoimmunitàries com l'artritis reumatoide (458–460), la diabetis de tipus I (461–463), la encefalomielitis autoimmunitària experimental (464,465) i el rebuig de l'empelt després del transplantament experimental (466,467), les DCs tolerogèniques

han estat recentment, i són actualment testades en assajos clínics en fase I i II per a processos al·loimmunitaris com la malaltia de l'empelt contra l'hoste (468) i autoimmunitaris com la diabetis de tipus I (65), l'artritis reumatoide (469,470), l'esclerosi múltiple (471,472) i la malaltia de Crohn (473).

La identificació, caracterització i concretament, l'aïllament i amplificació de les poblacions genuïnes de DCs reguladores i tolerogèniques de determinats teixits sans o danyats, de tipus MDSCs, s'ha mostrat com una tasca descoratjadora i ha mostrat una limitació real en el seu ús per a la transferència adoptiva en quant a benefici terapèutic. Així, degut a la gran plasticitat de les cèl·lules mieloides mononuclears com els monòcits i els protocols ben establerts d'expansió i diferenciació *ex vivo* de monòcits cap a Mo-DCs, basats en la utilització de citocines inflamatòries (GM-CSF i IL-4), aquestes han esdevingut productes cel·lulars terapèutics per aquest ús clínic (474).

Així, les DCs tolerogèniques s'han generat *ex vivo* a partir de monòcits de sang perifèrica, medul·la òssia i de cèl·lules progenitores de sang de cordó umbilical i han estat posteriorment condicionades amb intervencions farmacològiques per induir tolerogenicitat. En aquest sentit, un aspecte central per garantir un bon resultat en l'aplicació clínic de les Mo-DCs tolerogèniques està relacionat amb el seu desenvolupament i fabricació. Per això, s'han desenvolupat diferents protocols per una varietat d'agents utilitzats *in vitro* per dirigir les Mo-DCs cap a un fenotip tolerogènic o regulador (vitamina D3, fàrmacs immunosupressors com dexametasona i rapamicina, inhibidors de NF- κ B o un *cocktail* de citocines immunomoduladores com IL-10 i TGF- β), induint una acció oposada a la seva tendència "natural" per ser activades en un ambient pro-inflamatori. Aquestes aproximacions tenen l'objectiu d'induir el fenotip tolerogènic caracteritzat per una expressió disminuïda de molècules que participen en la co-estimulació i redueixen la seva habilitat per produir citocines pro-inflamatòries i estimulen la producció de citocines anti-inflamatòries (475) per induir tolerància *in vivo* a través de diferents mecanismes com l'anèrgia de cèl·lules T auto-reactives, la inducció de l'apoptosi o la inducció de poblacions de cèl·lules Treg i Breg. En la pràctica, malgrat induir aquest estat, s'ha reportat una eficàcia limitada en relació a la

Discussió

malaltia, tot i que en la majoria dels assajos s'ha vist un increment en els nivells de Treg en la sang durant l'administració de Mo-DCs (65,473,476).

A mesura que la fase I dels assajos clínics amb teràpia adoptiva de DCs tolerogèniques conclou, s'aprèn de forma preliminar informació sobre la seva seguretat, tot i que també es destaquen les limitacions actuals sobre la seva eficàcia. Els diferents protocols per a la generació d'aquestes vacunes, la dosi, vies i freqüència d'administració, dianes terapèutiques i el tipus de pacients involucrats, han impedit la comparació de les dades obtingudes en els assajos i han remarcat la necessitat d'harmonitzar/estandarditzar els assajos clínics futurs (477–479) així com la necessitat de marcadors clínics específics de la malaltia per monitoritzar el seu progrés abans i després de la teràpia. En la producció d'aquestes cèl·lules, s'ha observat que hi ha reptes importants que cal superar per obtenir resultats terapèutics efectius, incloent el fet d'aconseguir respostes tolerogèniques específiques i particularment, el manteniment d'aquest fenotip tolerogènic estable a través d'inductors immunomoduladors alternatius capaços d'incrementar el rendiment clínic en les patologies immune-inflamatòries.

En quant a la seva especificitat, de forma similar a les vacunes basades en DCs per al tractament del càncer, alguns estudis *in vivo* han documentat que les DCs tolerogèniques requereixen ser carregades amb antígens per assolir una resposta clínica eficient i específica (480,481) però en alguns casos, les DCs tolerogèniques carregades amb antígens han conduït a una incidència incrementada d'autoimmunitat (482). Tanmateix, en alguns desordres autoimmunitaris l'antigen específic roman sense identificar i no tots els pacients mostren un patró uniforme degut a l'existència de modificacions post-traduccionals o al desenvolupament de nous antígens durant la progressió de la malaltia, complicant la recerca cap a una diana antígen-específica i suggerint que les DCs tolerogèniques poden carregar antígens rellevants un cop injectades *in vivo* i induir tolerància antígen-específica (483).

El que està clar, és que el manteniment de Mo-DCs tolerogèniques en un estat immadur estable, resistent a l'activació i maduració és un requeriment fonamental per

al funcionament d'aquesta estratègia terapèutica, ja que les Mo-DCs considerades tolerogèniques en assajos *in vitro* poden revertir *in vivo* cap a un fenotip immunogènic en contacte amb un microambient pro-inflamatori, segons l'estat clínic del pacient, que podria agreujar la patologia (484,485). En aquest sentit, C4BP(β -) i PRP6-HO7 han mostrat una actuació limitada a l'etapa inicial de la diferenciació de les Mo-DCs, incrementant la seva especificitat en comparació amb els agents immunomoduladors actuals que necessiten estar presents durant tot el procés de diferenciació i maduració per induir un resultat tolerogènic. Aquesta activitat restringida a l'inici de la diferenciació podria induir una modificació més estable i permanent en la generació d'aquest fenotip tolerogènic que el que aconseguen els immunomoduladors que influencien les Mo-DCs en les últimes etapes del procés de diferenciació o pels agents que només modifiquen l'estat d'activació/maduració. Comparant amb els resultats dels assajos *in vitro*, C4BP(β -) sembla induir aquest fenotip funcional al menys de forma tan eficient com la vitamina D3 en la generació de Mo-DCs tolerogèniques de grau clínic per a la inducció i restauració de la tolerància immunològica (94). Tanmateix, s'ha demostrat que les Mo-DCs tolerogèniques induïdes amb C4BP(β -) i PRP6-HO7 de pacients de LES amb malaltia activa preserven el seu fenotip immadur quan són desafiades amb LPS i gardiquimod, dos estímuls fortament inflamatoris. D'aquesta manera, les DCs tolerogèniques generades són resistents a la maduració i no incrementen la seva secreció de TNF- α i IL-12p70 en resposta a aquests estímuls.

Per això, en protocols d'acondicionament de Mo-DCs tolerogèniques, establir el temps i la intensitat apropiada del règim de tractament tolerogènic, així com la inducció d'un fenotip estable i l'avaluació de la seva toxicitat, són aspectes crucials per tenir en compte per a l'èxit de la immunoteràpia basada en Mo-DCs (486). En quant a aquest últim aspecte, els cultius cel·lulars condicionats per rapamicina i dexametasona han mostrat reduir la quantitat de DCs recuperades (487,488). En aquest sentit, ni C4BP(β -) ni PRP6-HO7 han mostrat citotoxicitat en els cultius de Mo-DCs, el que sembla degut, en part, a la seva actuació en una finestra de temps estreta, a l'inici de la diferenciació però també a que C4BP(β -), per la seva condició com a proteïna de fase aguda pot assolir un ampli rang de concentracions fisiològiques en sèrum, fluctuant des de condicions homeostàtiques a condicions inflamatòries agudes. A més, la seva

presència simultània i incrementada sota condicions immune-inflamatòries, amb la generació de Mo-DCs podria incitar cap a una comunicació fisiològica entre aquest sistema humoral (proteïnes de fase aguda; C4BP(β -)) i el sistema cel·lular (Mo-DCs) amb l'objectiu comú de proveir de protecció i progressar cap a la resolució de la inflamació. D'aquesta manera, C4BP(β -) contribueix *in vivo* a la transformació dels fagòcits mononuclears cap a un estat anti-inflamatori, impulsant la restitució de la integritat tissular i la seva funció. En conseqüència aquesta interacció seria segura i efectiva en un ampli rang de concentracions.

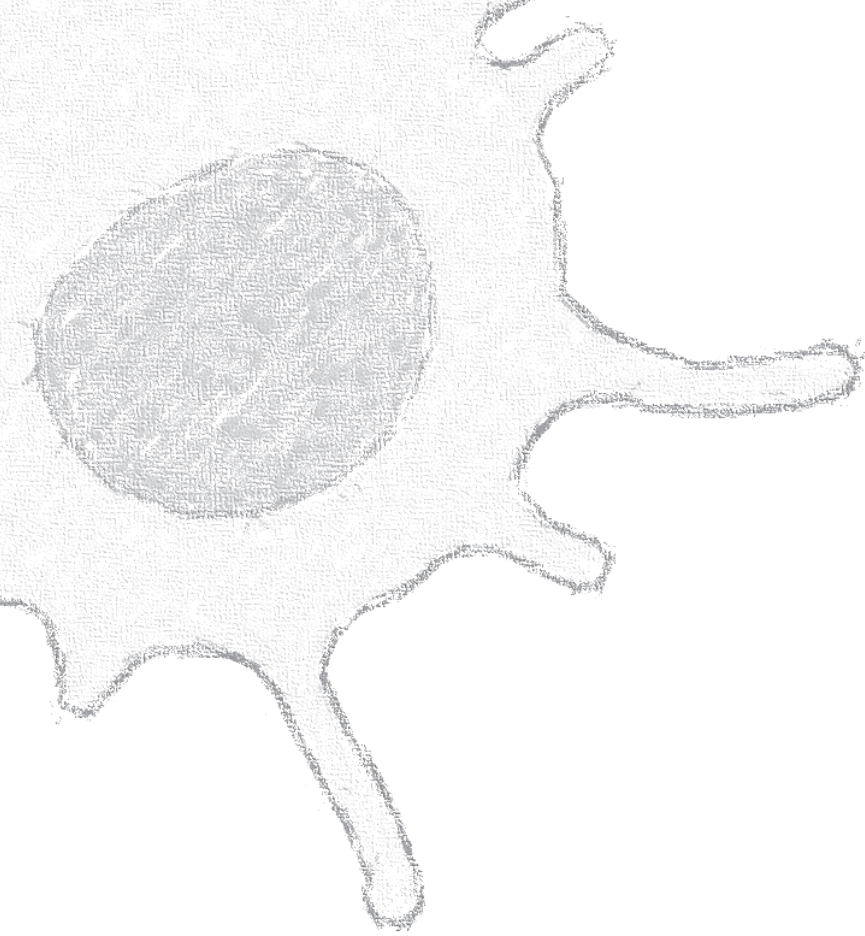
Addicionalment, aquesta nova variant, PRP6-HO7, és potencialment molt atractiva com a principi actiu farmacèutic degut a la seva capacitat per modular les Mo-DCs, mantenint una elevada viabilitat, amb una elevada eficiència i estabilitat en el manteniment d'aquesta hipo-resposta als estímuls pro-inflamatoris, i amb una especificitat incrementada en comparació amb C4BP(β -). Per aquest motiu, les DCs tolerogèniques obtingudes amb el tractament amb PRP6-HO7 podrien superar algunes de les limitacions de les Mo-DCs que s'utilitzen actualment en els assajos d'immunoteràpia en quan a estabilitat, seguretat i eficàcia.

L'assoliment d'aquesta immunoteràpia adoptiva basada en DCs tolerogèniques generades *ex vivo* presenta alguns inconvenients en ser una tècnica laboriosa, específica per a cada pacient, temps consumit i costos. Per superar aquestes limitacions es podrien plantejar noves aproximacions per establir DCs tolerogèniques *in vivo*, com l'administració directa d'aquests agents immunomoduladors, com C4BP(β -) o PRP6-HO7, ja sigui de forma "nua", donada en aquest cas, la seva especificitat restringida al(s) seu(s) receptor(s), o la seva administració en complexos amb biomaterials, nanopartícules o liposomes alliberats específicament a les DCs (489–491). De fet, les formulacions fetes en nanopartícules que tenen com a diana receptors específics en les DCs (DEC205, CLC9A i langerin per a les cDCs1, CLC4A4 per a les cDCs, CLEC7A (dectin 1) per a les cDCs2 i MoDCs, CD40 o CD11c (492–495) utilitzant anticossos per alliberar aquests agents, han estat utilitzades en assajos pre-clínic i en assajos clínics de fase I com a vacunes per onco-immunoteràpia. Així, la possibilitat de modular les Mo-DCs tolerogèniques *in vivo*, particularment en

l'ambient pro-inflamatori al·lo- o autoimmunitari on aquestes teràpies són aplicades, podria potenciar la seva eficàcia. A més, en comparació amb els protocols de generació de DCs *ex vivo*, la utilització d'aquests agents *in vivo*, permet produir aquestes vacunes a gran escala i permetria l'activació directa de subtipus naturals de DCs directament en el pacient.

D'aquesta manera l'objectiu principal en el tractament d'aquestes malalties seria la reintroducció d'autotolerància a llarg termini d'acord amb el concepte de tolerància infecciosa, que fa referència a un procés on un senyal tolerogènic, establert per una població reguladora, es manté i s'amplifica per inducció del fenotip tolerogènic en altres poblacions immunitàries, que en forma de *feedback* tenen la capacitat de continuar induint tolerància. En aquest sentit, les DCs tolerogèniques indueixen i reprogramen les cèl·lules Treg i Breg estimulants la producció de molècules immunosupressores com IL-10, IL-35 i TGF- β que poden desencadenar la diferenciació de monòcits i DCs cap a un fenotip immunomodulador *in vivo*, perpetuant el circuit de tolerància de forma recíproca i bidireccional. D'acord amb això, la teràpia d'inducció de DCs tolerogèniques podria proveir potencialment d'un benefici a llarg termini o esdevenir curatiu (496).

Finalment, i obrint pas als esdeveniments futurs, els inconvenients més importants en la utilització d'aquest tipus d'immunomoduladors com PRP6-HO7, recau en el fet de que els mecanismes moleculars d'acció en la transformació de les Mo-DCs cap a un fenotip tolerogènic encara són desconeguts. Així, els propers estudis, basats en tècniques de transcriptòmica i anàlisi de l'expressió gènica diferencial seran de gran utilitat per desxifrar les molècules de superfície cel·lular amb les que interaccionen i les vies de senyalització i metabòliques que estan involucrades en aquesta programació i el resultat funcional distintiu conseqüent de les Mo-DCs tolerogèniques induïdes per aquest tractament. En paral·lel, el coneixement sobre els mecanismes reguladors que exerceixen les DCs tolerogèniques com organitzadores i orquestradores de les respostes immunitàries (497,498) en un ambient inflamatori complex com esdevé en la NL i la CU, permetrà millorar el panorama terapèutic cap a una medicina personalitzada segura i efectiva.



6. CONCLUSIONS

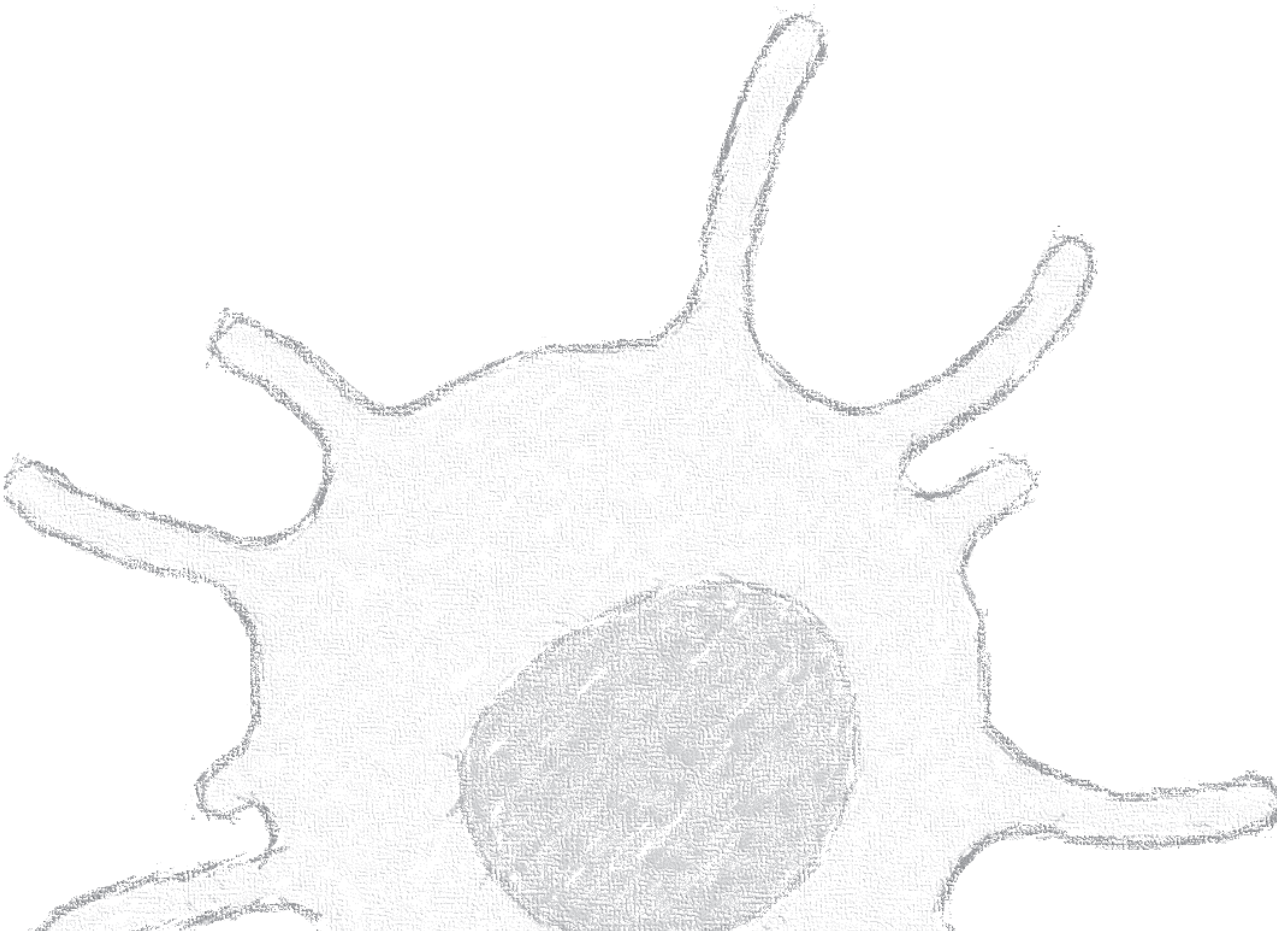
En base als objectius establerts en aquesta tesi doctoral, les conclusions del treball que s'ha presentat són les següents:

- La proteïna humana C4BP(β^-), però no C4BP(β^+), evita el desenvolupament de proteïnúria, disminueix la formació d'anticossos anti-dsDNA i mitiga, localment, la formació de dipòsits renals d'IgG i C3, així com la generació de cèl·lules apoptòtiques, amb la conseqüent millora histopatològica a nivell renal en el model murí de LES NZBW F1.
- C4BP(β^-) presenta una eficàcia terapèutica anàloga a l'immunosupressor d'ampli espectre ciclofosfamida però mostra una signatura d'expressió gènica renal 10 vegades menor i el seu efecte immunomodulador revela una disminució de l'expressió de transcrits rellevants en la NL, indicant una menor infiltració cel·lular immunopatogènica confirmada per immunohistoquímica del còrtex renal dels ratolins NZBW F1.
- A través de la disminució de l'expressió sistèmica i local de la quimiocina CXCL13, C4BP(β^-) evita la neogènesi d'estructures limfoides ectòpiques en els ronyons dels ratolins amb NL del model de LES NZBW F1.
- En un segon model experimental de LES, MRL-lpr, el tractament amb C4BP(β^-) mitiga el desenvolupament de proteïnúria, incrementa la taxa de supervivència, i a nivell histològic, preserva l'estructura renal i evita la formació de teixit limfoide ectòpic. A més, atenua el desenvolupament de dermatitis i vasculitis que caracteritza aquest model.
- En el model de CU aguda induïda per DSS, C4BP(β^-) atenua la pèrdua de pes i mitiga el desenvolupament dels trets patològics macroscòpics associats al dany inflamatori intestinal.
- A nivell histològic, C4BP(β^-) preserva l'estructura de les criptes de la mucosa intestinal del ratolins amb CU induïda per DSS, mantenint l'expressió de les proteïnes de les unions estretes i evitant el desenvolupament d'endotoxèmia, d'acord amb una atenuació de la resposta inflamatòria sistèmica i la conseqüent cascada de secreció de citocines pro-inflamatòries i de quimiocines involucrades en el reclutament de neutròfils i monòcits inflamatoris.

Conclusions

- L'anàlisi de l'expressió gènica confirma que C4BP(β -) indueix una regulació de transcrits relacionats amb la infiltració inflamatòria, principalment neutrofílica i l'anàlisi immunohistoquímic del teixit intestinal confirma una menor infiltració de cèl·lules immunitàries en aquest model de CU induïda per DSS.
- En la caracterització estructural i funcional de C4BP(β -) s'evidencia que la incorporació de la cadena β en l'oligòmer format per les cadenes α de C4BP interfereix amb la seva activitat immunomoduladora.
- Una variant oligomèrica que conté només el domini CCP6 de la cadena α de C4BP, anomenada PRP6-HO7, és suficient per "reprogramar" les Mo-DCs des d'un fenotip pro-inflamatori i immunogènic cap a un estat anti-inflamatori i tolerogènic.
- PRP6-HO7 no presenta activitat reguladora del sistema del complement però reté l'activitat immunomoduladora completa, anàloga a la de C4BP(β -), sobre Mo-DCs estimulades via TLRs, caracteritzades fenotípicament per una disminució de l'expressió dels marcadors d'activació i maduració de superfície cel·lular com CD83, HLA-DR i les molècules co-estimuladores CD86, CD80 i CD40.
- A nivell funcional, les Mo-DCs tractades amb PRP6-HO7 disminueixen la secreció de citocines pro-inflamatòries com IL-12 i TNF- α , mostren una endocitosi incrementada, una expressió reduïda de CCR7 i de l'activitat quimiotàctica mediada per CCL21; i eviten l'alloproliferació de cèl·lules T.
- En l'estudi del seu potencial terapèutic, PRP6-HO7 modula l'activació intrínseca i mediada per TLRs de les DCs i dels macròfags derivats de monòcits *in vitro*, aïllats de pacients amb LES actiu; i en el model animal de CU induïda per DSS reverteix la pèrdua de pes, disminueix l'activitat de la malaltia i a nivell histològic, preserva l'estructura de la mucosa intestinal, de forma anàloga a C4BP(β -).

7. BIBLIOGRAFIA



1. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1274–81.
2. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298–300.
3. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol*. 2018;9:2379.
4. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*. 2021;26(3-4):152–62.
5. Kumar V. The complement system, toll-like receptors and inflammasomes in host defense: three musketeers' one target. *Int Rev Immunol*. 2019;38(4):131–56.
6. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):168–79.
7. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011;30(1):16–34.
8. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*. 2020;180(6):1044–66.
9. Lee SMY, Yip TF, Yan S, Jin DY, Wei HL, Guo RT, et al. Recognition of double-stranded RNA and regulation of interferon pathway by Toll-like receptor 10. *Front Immunol*. 2018;9:516.
10. Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X, Fleming SD. Humoral innate immune response and disease. *Clin Immunol*. 2012;144(2):142–58.
11. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:157–83.
12. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature*. 2008;456(7224):989–92.
13. Smole U, Kratzer B, Pickl WF. Soluble pattern recognition molecules: guardians and regulators of homeostasis at airway mucosal surfaces. *Eur J Immunol*. 2020;50(5):624–42.
14. Nesargikar P, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012;2(2):103–11.
15. Holers VM. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:433–59.
16. Dustin ML. Complement receptors in myeloid cell adhesion and phagocytosis. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6).
17. Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol*. 2009;30(2):83–90.

Bibliografia

18. Liszewski MK, Atkinson JP. Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *J Intern Med.* 2015;277(3):294–305.
19. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure. *Arch Immunol Ther Exp.* 2004;52(2):83-95.
20. Ogden CA, DeCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Fadok B, Ghebrehiwet VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2001;194(6):781–96.
21. Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, Shapira I, Hareuveni M, Ben-Tal O, et al. Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC Chemokine Receptor 7. *J Exp Med.* 2002;196(12):1553–61.
22. Martin M, Blom AM. Complement in removal of the dead – balancing inflammation. *Immunol Rev.* 2016;274(1):218–32.
23. Romano R, Giardino G, Cirillo E, Prencipe R, Pignata C. Complement system network in cell physiology and in human diseases. *Int Rev Immunol.* 2021;40(3):159–70.
24. Freeley S, Kemper C, Le Fric G. The “ins and outs” of complement-driven immune responses. *Immunol Rev.* 2016;274(1):16–32.
25. Arbore G, Kemper C, Kolev M. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol Immunol.* 2017;89:2–9.
26. Kolev M, Fric G Le, Kemper C. Complement — tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(12):811–20.
27. Hajishengallis G, Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Novel mechanisms and functions of complement. *Nat Immunol.* 2017;18(12):1288–98.
28. Reis ES, Barbuto JAM, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res.* 2006;55(5):179–84.
29. West EE, Kunz N, Kemper C. Complement and human T cell metabolism: location, location, location. *Immunol Rev.* 2020;295(1):68–81.
30. Liszewski MK, Elvington M, Kulkarni HS, Atkinson JP. Complement’s hidden arsenal: new insights and novel functions inside the cell. *Mol Immunol.* 2017;84:2–9.
31. Crispe IN. Hepatocytes as immunological agents. *J Immunol.* 2016;196(1):17–21.
32. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448–54.
33. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 2013;5(5):661–74.
34. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S33–40.

35. Zhu X, Zhu J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8011.
36. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(7):634–43.
37. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol.* 2016;28(4):163–71.
38. Hossein-Khannazer N, Zian Z, Bakkach J, Kamali AN, Hosseinzadeh R, Anka AU, et al. Features and roles of T helper 22 cells in immunological diseases and malignancies. *Scand J Immunol.* 2021;93(5):e13030.
39. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001;357(9270):1777–89.
40. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal center B cell dynamics. *Immunity.* 2016;45(3):471–82.
41. Smith KGC, Clatworthy MR. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):328–43.
42. Lu J, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Pentraxins and Fc receptor-mediated immune responses. *Front Immunol.* 2018;9:2607.
43. Achour A, Simon Q, Mohr A, Séité JF, Youinou P, Bendaoud B, et al. Human regulatory B cells control the Tfh cell response. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(1):215–22.
44. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting Th1 and Th17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5(173):173ra23.
45. Collin M, Bigley V. Monocyte, macrophage, and dendritic cell development: the human perspective. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5).
46. Jung H, Mithal DS, Park JE, Miller RJ. Localized CCR2 activation in the bone marrow niche mobilizes monocytes by desensitizing CXCR4. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128387.
47. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):349–62.
48. Coillard A, Segura E. In vivo differentiation of human monocytes. *Front Immunol.* 2019;10:1907.
49. Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity.* 2013;39(5):925–38.
50. Croxford AL, Lanzinger M, Hartmann FJ, Schreiner B, Mair F, Pelczar P, et al. The cytokine GM-CSF drives the inflammatory signature of CCR2+ monocytes and licenses autoimmunity. *Immunity.* 2015;43(3):502–14.

Bibliografia

51. Morias Y, Abels C, Laoui D, Van Overmeire E, Guilliams M, Schouppe E, et al. Ly6C-monocytes regulate parasite-induced liver inflammation by inducing the differentiation of pathogenic Ly6C⁺ monocytes into macrophages. *PLoS Pathog.* 2015;11(5):e1004873.
52. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677–86.
53. Sallusto F, Lanzavecchi A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109–18.
54. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 2013;38(2):336–48.
55. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol.* 2007;179(11):7577–84.
56. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 2014;33(10):1104–16.
57. Fernández R, Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, Luis J. The Multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol.* 2006;176(9):5153–9.
58. Manh TPV, Alexandre Y, Baranek T, Crozat K, Dalod M. Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *Eur J Immunol.* 2013;43(7):1706–15.
59. Süss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1996;183(4):1789–96.
60. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Trail). *J Exp Med.* 1999;190(8):1155–64.
61. Lee GK, Park HJ, MacLeod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology.* 2002;107(4):452–60.
62. Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Chused TM, Schwartz RH. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in interleukin 2-producing helper T-lymphocyte clones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(15):5409–13.
63. Song S, Yuan P, Wu H, Chen J, Fu J, Li P, et al. Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF- β induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;20(1):117–23.

64. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011;332(6029):600–3.
65. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011;34(9):2026–32.
66. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, et al. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest*. 2013;123(2):844–54.
67. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162–74.
68. Serrano I, Luque A, Aran JM. Exploring the immunomodulatory moonlighting activities of acute phase proteins for tolerogenic dendritic cell generation. *Front Immunol*. 2018;9:892.
69. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53(1):41–57.
70. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47209.
71. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Müller M, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*. 2010;207(7):1453–64.
72. Zhang R, Becnel L, Li M, Chen C, Yao Q. C-reactive protein impairs human CD14+ monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function. *Eur J Immunol*. 2006;36(11):2993–3006.
73. MacDonald SL, Kilpatrick DC. Human serum amyloid P component binds to peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol*. 2006;64(1):48–52.
74. Braunschweig A, Józsi M. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS One*. 2011;6(8):e23991.
75. Ortega-Hernandez OD, Bassi N, Shoenfeld Y, Anaya JM. The long pentraxin 3 and its role in autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum*. 2009;39(1):38–54.
76. Luque A, Serrano I, Aran JM. Complement components as promoters of immunological tolerance in dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;85:143–52.
77. Xu XY, Li HJ, Zhang LY, Lu X, Zuo DM, Shan GQ, et al. Mannan-binding lectin at supraphysiological concentrations inhibits differentiation of dendritic cells from human CD14+ monocytes. *Microbiol Immunol*. 2015;59(12):724–34.

Bibliografia

78. Wang M, Zhang Y, Chen Y, Zhang L, Lu X, Chen Z. Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. *BMC Immunol.* 2011;12(1):1–10.
79. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):1020–30.
80. Hosszu KK, Santiago-Schwarz F, Peerschke ELB, Ghebrehiwet B. Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate Immun.* 2010;16(2):115–27.
81. Waggoner SN, Cruise M, Kassel R, Hahn YS. gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol.* 2005; 175(7):4706-14.
82. Son M, Santiago-Schwarz F, Al-Abed Y, Diamond B. C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(46):E3160-7.
83. Son M, Diamond B, Volpe BT, Aranow CB, Meggan C, Santiago-Schwarz F. Evidence for C1q-mediated crosslinking of CD33/LAIR-1 inhibitory immunoreceptors and biological control of CD33/LAIR-1 expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):270.
84. Clarke E V., Weist BM, Walsh CM, Tenner AJ. Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation. *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):147–60.
85. Castellano G, Woltman AM, Nauta AJ, Roos A, Trouw LA, Seelen MA, et al. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood.* 2004;103(10):3813–20.
86. Yamada M, Oritani K, Kaisho T, Ishikawa J, Yoshida H, Takahashi I, et al. Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004;34(1):221–30.
87. Li K, Fazekasova H, Wang N, Peng Q, Sacks SH, Lombardi G, et al. Functional modulation of human monocytes derived DCs by anaphylatoxins C3a and C5a. *Immunobiology.* 2012;217(1):65–73.
88. Zaal A, Lissenberg-Thunnissen SN, van Schijndel G, Wouters D, van Ham SM, ten Brinke A. Crosstalk between Toll like receptors and C5a receptor in human monocyte derived DCs suppress inflammatory cytokine production. *Immunobiology.* 2013;218(2):175–80.
89. Luo X, Liu L, Tang N, Lu KQ, McCormick TS, Kang K, et al. Inhibition of monocyte-derived dendritic cell differentiation and interleukin-12 production by complement iC3b via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Exp Dermatol.* 2005;14(4):303–10.

90. Sohn JH, Bora PS, Suk HJ, Molina H, Kaplan HJ, Bora NS. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med*. 2003;9(2):206–12.
91. Hsieh CC, Chou HS, Yang HR, Lin F, Bhatt S, Qin J, et al. The role of complement component 3 (C3) in differentiation of myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 2013;121(10):1760–8.
92. Yang Y, Chung EK, Yee LW, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human Systemic Lupus Erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet*. 2007;80(6):1037–54.
93. Cheng in, Chen RY, Wu JP, Chen L, Liang YH, Pan HF, et al. Complement C4 induces regulatory T cells differentiation through dendritic cell in systemic lupus erythematosus. *Cell Biosci*. 2015;5:73.
94. Olivar R, Luque A, Naranjo-Gómez M, Quer J, García de Frutos P, Borràs FE, et al. The $\alpha7\beta0$ isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J Immunol*. 2013;190(6):2857–72.
95. Olivar R, Luque A, Cárdenas-Brito S, Naranjo-Gómez M, Blom AM, Borràs FE, et al. The complement inhibitor Factor H generates an anti-inflammatory and tolerogenic state in monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2016;196(10):4274–90.
96. Hourcade D, Liszewski MK, Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology*. 2000;49(1–2):103–16.
97. Blom AM. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(6):978–82.
98. Kask L, Hillarp A, Ramesh B, Dahlbäck B, Blom AM. Structural requirements for the intracellular subunit polymerization of the complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochemistry*. 2002;41(30):9349–57.
99. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein—friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol*. 2004;40(18):1333–46.
100. Hillarp A, Dahlbäck B. Novel subunit in C4b-binding protein required for protein S binding. *J Biol Chem*. 1988;263(25):12759–64.
101. Hillarp A, Dahlbäck B. Cloning of cDNA coding for the β chain of human complement component C4b-binding protein: Sequence homology with the α chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(3):1183–7.
102. Dahlbäck B, Smith CA, Muller Eberhard HJ. Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80(11):3461–5.

Bibliografia

103. Kristensen T, Ogata RT, Chung LP, Reid KBM, Tack BF. cDNA structure of murine C4b-binding protein, a regulatory component of the serum complement system. *Biochemistry*. 1987;26(15):4668–74.
104. Sánchez-Corral P, Criado García O, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. I. Molecular basis for the C4BP isoform pattern and its variations in human plasma. *J Immunol*. 1995;155(8):4030-6.
105. Andersson A, Dahlbäck B, Hanson C, Hillarp A, Levan G, Szpirer J, et al. Genes for C4b-binding protein alpha- and beta-chains (C4BPA and C4BPB) are located on chromosome 1, band 1q32, in humans and on chromosome 13 in rats. *Somat Cell Mol Genet*. 1990;16(5):493–500.
106. Barnum SR, Dahlbäck B. C4b-binding protein, a regulatory component of the classical pathway of complement, is an acute-phase protein and is elevated in systemic lupus erythematosus. *Complement Inflamm*. 1990;7(2):71–7.
107. Marcovina SM, Zoppo A, Viganó-D'Angelo S, Di Cola G, D'Angelo A. Determination of serum levels of complement component C4b-binding protein: influence of age and inflammation. *Int J Clin Lab Res*. 1991;21(2):171–5.
108. Criado García O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J Immunol*. 1995;155(8):4037-43.
109. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b-binding protein modulates complement activation. *J Immunol*. 2011;187(1):424–33.
110. Blom AM, Kask L, Dahlbäck B. CCP1–4 of the C4b-binding protein α -chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Mol Immunol*. 2003;39(10):547–56.
111. Ziccardi RJ, Dahlbäck B, Müller-Eberhard HJ. Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands. *J Biol Chem*. 1984;259(22):13674–9.
112. Blom AM, Kask L, Dahlbäck B. Structural requirements for the complement regulatory activities of C4BP. *J Biol Chem*. 2001;276(29):27136–44.
113. Blom AM, Webb J, Villoutreix BO, Dahlbäck B. A cluster of positively charged amino acids in the C4BP α -chain is crucial for C4b binding and Factor I cofactor function. *J Biol Chem*. 1999;274(27):19237–45.
114. García de Frutos P, Alim RI, Härdig Y, Zöller B, Dahlbäck B. Differential Regulation of α and β chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. *Blood*. 1994;84(3):815–22.
115. Sjöberg AP, Trouw LA, McGrath FDG, Hack CE, Blom AM. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. *J Immunol*. 2006;176(12):7612–20.

116. Westein E, Denis CV, Bouma BN, Lenting PJ. The α -chains of C4b-binding protein mediate complex formation with low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2511–6.
117. Brodeur SR, Angelini F, Bacharier LB, Blom AM, Mizoguchi E, Fujiwara H, et al. C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity.* 2003;18(6):837–48.
118. Härdig Y, Rezaie A, Dahlbäck B. High affinity binding of human vitamin K-dependent protein S to a truncated recombinant beta-chain of C4b-binding protein expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3033–6.
119. Härdig Y, Dahlbäck B. The amino-terminal module of the C4b-binding protein β -chain contains the protein S-binding site. *J Biol Chem.* 1996;271(34):20861–7.
120. Dahlbäck B. Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem.* 1986;261(26):12022–7.
121. Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost.* 1991;66(1):49–61.
122. Kask L, Trouw LA, Dahlbäck B, Blom AM. The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2004;279(23):23869–73.
123. Trouw LA, Nilsson SC, Gonçalves I, Landberg G, Blom AM. C4b-binding protein binds to necrotic cells and DNA, limiting DNA release and inhibiting complement activation. *J Exp Med.* 2005;201(12):1937–48.
124. Trouw LA, Bengtsson AA, Gelderman KA, Dahlbäck B, Sturfelt G, Blom AM. C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J Biol Chem.* 2007;282(39):28540–8.
125. Morante-Palacios O, Fondelli F, Ballestar E, Martínez-Cáceres EM. Tolerogenic dendritic cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 2021;42(1):59–75.
126. Toubi E, Vadasz Z. Innate immune-responses and their role in driving autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2019;18(3):306–11.
127. Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(7):1274–81.
128. Chalayer E, Gramont B, Zekre F, Goguyer-Deschaumes R, Waeckel L, Grange L, et al. Fc receptors gone wrong: a comprehensive review of their roles in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2022;21(3):103016.
129. Mackern-Oberti JP, Llanos C, Vega F, Salazar-Onfray F, Riedel CA, Bueno SM, et al. Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2015;14(2):127–39.

Bibliografia

130. Ohnmacht C, Pullner A, King SBS, Drexler I, Meier S, Brocker T, et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med*. 2009;206(3):549–59.
131. Tsokos GC. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 2020;21(6):605–14.
132. Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;40(1):66–73.
133. Shelly S, Boaz M, Orbach H. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2012;11(6–7):A465–70.
134. Deafen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1992;35(3):311–8.
135. Nelson P, Rylance P, Roden D, Trela M, Tugnet N. Viruses as potential pathogenic agents in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2014;23(6):596–605.
136. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*. 2004;6(15):1382–7.
137. Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2008;96(1):15–9.
138. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485–98.
139. Morris DL, Taylor KE, Fernando MMA, Nititham J, Alarcón-Riquelme ME, Barcellos LF, et al. Unraveling multiple MHC gene associations with systemic lupus erythematosus: model choice indicates a role for HLA alleles and non-HLA genes in europeans. *Am J Hum Genet*. 2012;91(5):778–93.
140. Deng Y, Tsao BP. Updates in lupus genetics. *Curr Rheumatol Reports*. 2017;19(11):68.
141. Farh KKH, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*. 2015;518(7539):337–43.
142. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(12):716–30.
143. Ballestar E, Esteller M, Richardson BC. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2006;176(12):7143–7.
144. Coit P, Yalavarthi S, Ognenovski M, Zhao W, Hasni S, Wren JD, et al. Epigenome profiling reveals significant DNA demethylation of interferon signature genes in lupus neutrophils. *J Autoimmun*. 2015;58:59–66.

145. Coit P, Ortiz-Fernandez L, Lewis EE, McCune WJ, Maksimowicz-McKinnon K, Sawalha AH. A longitudinal and transancestral analysis of DNA methylation patterns and disease activity in lupus patients. *JCI Insight*. 2020;5(22):e143654.
146. Cornacchia E, Golbus J, Maybaum J, Strahler J, Hanash S, Richardson B. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol*. 1988;140(7):2197-200.
147. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2007;16(12):939-46.
148. Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int*. 2008;29(7):749-54.
149. Stagakis E, Bertias G, Verginis P, Nakou M, Hatzia Apostolou M, Kritikos H, et al. Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(8):1496-506.
150. Pisetsky DS, Lipsky PE. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(10):565-79.
151. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(5):280-9.
152. Gullstrand B, Mårtensson U, Sturfelt G, Bengtsson AA, Truedsson L. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(2):303-11.
153. Sjöberg AP, Manderson GA, Mörgelin M, Day AJ, Heinegård D, Blom AM. Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Mol Immunol*. 2009;46(5):830-9.
154. Cook HT, Botto M. Mechanisms of disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(6):330-7.
155. Monteith AJ, Kang S, Scott E, Hillman K, Rajfur Z, Jacobson K, et al. Defects in lysosomal maturation facilitate the activation of innate sensors in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(15):E2142-51.
156. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(7):402-13.
157. Krieg AM. The Toll of too much TLR7. *Immunity*. 2007;27(5):695-7.
158. Rowland SL, Riggs JM, Gilfillan S, Bugatti M, Vermi W, Kolbeck R, et al. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *J Exp Med*. 2014;211(10):1977-91.

Bibliografia

159. Sisirak V, Ganguly D, Lewis KL, Couillault C, Tanaka L, Bolland S, et al. Genetic evidence for the role of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2014;211(10):1969–76.
160. Baechler EC, Gregersen PK, Behrens TW. The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(6):801–7.
161. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science*. 2001;294(5546):1540–3.
162. Das A, Heesters BA, Bialas A, O'Flynn J, Rifkin IR, Ochando J, et al. Follicular dendritic cell activation by TLR ligands promotes autoreactive B cell responses. *Immunity*. 2017;46(1):106–19.
163. Cherukuri A, Cheng PC, Sohn HW, Pierce SK. The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity*. 2001;14(2):169–79.
164. Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol*. 2005;174(7):4043–50.
165. Solomou EE, Juang Y-T, Gourley MF, Kammer GM, Tsokos GC. Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2001;166(6):4216–22.
166. Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S. Dysfunctional CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon- α -producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):801–12.
167. Badr G, Borhis G, Lefevre EA, Chaoul N, Deshayes F, Dessirier V, et al. BAFF enhances chemotaxis of primary human B cells: a particular synergy between BAFF and CXCL13 on memory B cells. *Blood*. 2008;111(5):2744–54.
168. Kang S, Fedoriv Y, Brennehan EK, Truong YK, Kikly K, Vilen BJ. BAFF induces tertiary lymphoid structures and positions T cells within the glomeruli during lupus nephritis. *J Immunol*. 2017;198(7):2602–11.
169. Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2550–7.
170. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*. 2008;88(2):451–87.
171. Ichinose K, Juang YT, Crispín JC, Kis-Toth K, Tsokos GC. Suppression of autoimmunity and organ pathology in lupus-prone mice upon inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV. *Arthritis Rheum*. 2011;63(2):523–9.

172. Ichinose K, Rauen T, Juang YT, Kis-Toth K, Mizui M, Koga T, et al. Cutting edge: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV is essential for mesangial cell proliferation and lupus nephritis. *J Immunol.* 2011;187(11):5500–4.
173. Maeda K, Otomo K, Yoshida N, Abu-Asab MS, Ichinose K, Nishino T, et al. CaMK4 compromises podocyte function in autoimmune and nonautoimmune kidney disease. *J Clin Invest.* 2018;128(8):3445–59.
174. Lech M, Anders HJ. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(9):1357–66.
175. Morales E, Galindo M, Trujillo H, Praga M. Update on lupus nephritis: looking for a new vision. *Nephron.* 2021;145(1):1–13.
176. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Beek CA Van, Stillman IE, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol.* 2008;181(12):8761–6.
177. Kytтарыс VC, Kampagianni O, Tsokos GC. Treatment with anti-interleukin 23 antibody ameliorates disease in lupus-prone mice. *Biomed Res Int.* 2013;2013:861028.
178. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, et al. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol.* 2011;186(3):1849–60.
179. Park SH, Kang K, Giannopoulou E, Qiao Y, Kang K, Kim G, et al. Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. *Nat Immunol.* 2017;18(10):1104–16.
180. Sahu R, Bethunaickan R, Singh S, Davidson A. Structure and function of renal macrophages and dendritic cells from lupus-prone mice. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(6):1596–607.
181. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(2):241–50.
182. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V., Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* 2004;65(2):521–30.
183. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Bruijn JA, Colvin RB, Cook HT, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney Int.* 2018;93(4):789–96.
184. Luijten KMAC, Tekstra J, Bijlsma JWW, Bijl M. The Systemic Lupus Erythematosus Responder Index (SRI); a new SLE disease activity assessment. *Autoimmun Rev.* 2012;11(5):326–9.
185. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002;29(2):288–91.

Bibliografia

186. Petri M, Buyon J, Kim M. Classification and definition of major flares in SLE clinical trials. *Lupus*. 1999;8(8):685–91.
187. Chessa E, Piga M, Floris A, Devilliers H, Cauli A, Arnaud L. Use of Physician Global Assessment in systemic lupus erythematosus: a systematic review of its psychometric properties. *Rheumatology*. 2020;59(12):3622–32.
188. Franklyn K, Lau CS, Navarra S V., Louthrenoo W, Lateef A, Hamijoyo L, et al. Definition and initial validation of a Lupus Low Disease Activity State (LLDAS). *Ann Rheum Dis*. 2016;75(9):1615–21.
189. Van Vollenhoven R, Voskuyl A, Bertsias G, Aranow C, Aringer M, Arnaud L, et al. A framework for remission in SLE: consensus findings from a large international task force on definitions of remission in SLE (DORIS). *Ann Rheum Dis*. 2017;76(3):554–61.
190. van Vollenhoven RF, Bertsias G, Doria A, Isenberg D, Morand E, Petri MA, et al. 2021 DORIS definition of remission in SLE: final recommendations from an international task force. *Lupus Sci Med*. 2021;8(1):e000538.
191. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JHM, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(11):1771–82.
192. Gordon C, Amissah-Arthur MB, Gayed M, Brown S, Bruce IN, D’Cruz D, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults. *Rheumatology*. 2018;57(1):e1–e45.
193. Pons-Estel BA, Bonfa E, Soriano ER, Cardiel MH, Izcovich A, Popoff F, et al. First Latin American clinical practice guidelines for the treatment of systemic lupus erythematosus: Latin American Group for the Study of Lupus (GLADEL, Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus)–Pan-American League of Associations of Rheumatology (PANLAR). *Ann Rheum Dis*. 2018;77(11):1549–57.
194. Furie R, Petri M, Zamani O, Cervera R, Wallace DJ, Tegzová D, et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011;63(12):3918–30.
195. Navarra S V., Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2011;377(9767):721–31.
196. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: The randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):222–33.

197. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1215–26.
198. Venuturupalli S. Rethinking biologics in lupus nephritis. *Lupus*. 2016;25(10):1102–10.
199. Gatto M, Zen M, Iaccarino L, Doria A. New therapeutic strategies in systemic lupus erythematosus management. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(1):30–48.
200. Durcan L, O'Dwyer T, Petri M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. *Lancet*. 2019;393(10188):2332–43.
201. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(6):736–45.
202. Furie R, Rovin BH, Houssiau F, Malvar A, Teng YKO, Contreras G, et al. Two-year, randomized, controlled trial of belimumab in lupus nephritis. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1117–28.
203. Moore E, Putterman C. Are lupus animal models useful for understanding and developing new therapies for human SLE? *J Autoimmun*. 2020;112:102490.
204. Richard ML, Gilkeson G. Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci Med*. 2018;5(1):e000199.
205. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, Meconahey PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. 1978;148(5):1198–215.
206. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390(10114):2769–78.
207. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(Suppl 1):S3-9
208. Benchimol EI, Mack DR, Guttman A, Nguyen GC, To T, Mojaverian N, et al. Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: A population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(4):553–63.
209. Banerjee R, Pal P, Nugent Z, Ganesh G, Adigopula B, Pendyala S, et al. IBD in India: similar phenotype but different demographics than the west. *J Clin Gastroenterol*. 2020;54(8):725–32.
210. Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2020;49(4):643–54.
211. Annese V. Genetics and epigenetics of IBD. *Pharmacol Res*. 2020;159:104892.

Bibliografía

212. Kopylov U, Boucher G, Waterman M, Rivers CR, Patel M, Cho JH, et al. Genetic predictors of benign course of ulcerative colitis-A north american inflammatory bowel disease genetics consortium study. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(10):2311–6.
213. López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda De Miguel D, Fernández-Rodríguez CM. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a spanish case–control study. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(12):1464–71.
214. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(11):1462–71.
215. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(1):171–6.
216. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2001;344(11):808–14.
217. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2008;135(3):781–6.
218. Takeuchi K, Smale S, Premchand P, Maiden L, Sherwood R, Thjodleifsson B, et al. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(2):196–202.
219. Cornish JA, Tan E, Smillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(9):2394-400.
220. Xu L, Lochhead P, Ko Y, Claggett B, Leong RW, Ananthakrishnan AN. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(9):780–9.
221. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4):e00036-17.
222. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, De Silva P, Fuchs CS, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2014;63(5):776–84.
223. Racine A, Carbonnel F, Chan SSM, Hart AR, Bueno de Mesquita HB, Oldenburg B, et al. Dietary patterns and risk of inflammatory bowel disease in Europe: results from the EPIC study. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(2):345–54.
224. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell.* 2016;167(5):1339-1353.e21.

225. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(1):16–27.
226. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(34):13780–5.
227. Guo XY, Liu XJ, Hao JY. Gut microbiota in ulcerative colitis: insights on pathogenesis and treatment. *J Dig Dis*. 2020;21(3):147–59.
228. Xu J, Chen N, Wu Z, Song Y, Zhang Y, Wu N, et al. 5-aminosalicylic acid alters the gut bacterial microbiota in patients with ulcerative colitis. *Front Microbiol*. 2018;9:1274.
229. Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, et al. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome Res*. 2011;10(9):4208–18.
230. Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC, Owen MJ. T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol*. 1997;150(1):91-7.
231. Veltkamp C, Tonkonogy SL, De Jong YP, Albright C, Grenther WB, Balish E, et al. Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in Tg(epsilon26) mice. *Gastroenterology*. 2001;120(4):900–13.
232. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):3–20.
233. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799–809.
234. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res*. 2011;317(19):2702–10.
235. Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(5):263–78.
236. Knoop KA, Newberry RD. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol*. 2018;11(6):1551–7.
237. Von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature*. 2016;529(7585):221–5.
238. Worthington JJ, Reimann F, Gribble FM. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):3–20.
239. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343–53.

Bibliografia

240. Nakase H, Sato N, Mizuno N, Ikawa Y. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev.* 2022;21(3):103017.
241. McCauley HA, Guasch G. Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol Med.* 2015;21(8):492–503.
242. Dinallo V, Marafini I, Fusco D Di, Laudisi F, Franzè E, Grazia A Di, et al. Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis.* 2019;13(6):772–84.
243. Colonna M. Introduction: basic and emerging concepts in ILC biology. *Immunol Rev.* 2018;286(1):4–5.
244. Forkel M, VanTol S, Höög C, Michaëlsson J, Almer S, Mjösberg J. Distinct alterations in the composition of mucosal innate lymphoid cells in newly diagnosed and established Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis.* 2019;13(1):67–78.
245. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2005;129(1):50–65.
246. Rampal R, Awasthi A, Ahuja V. Retinoic acid-primed human dendritic cells inhibit Th9 cells and induce Th1/Th17 cell differentiation. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):111–20.
247. Kappeler A, Mueller C. The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. *Histol Histopathol.* 2000;15(1):167–72.
248. Seidelin JB, Coskun M, Kvist PH, Holm TL, Holgersen K, Nielsen OH. IL-33 promotes GATA-3 polarization of gut-derived T cells in experimental and ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2014;50(2):180–90.
249. Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol.* 2008;1(Suppl 1):S58–61.
250. Shohan M, Elahi S, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, Bagheri N, Soltani E. Th9 Cells: probable players in ulcerative colitis pathogenesis. *Int Rev Immunol.* 2018;37(4):192–205.
251. Zhao J, Lu Q, Liu Y, Shi Z, Hu L, Zeng Z, et al. Th17 cells in inflammatory bowel disease: cytokines, plasticity and therapies. *J Immunol Res.* 2021;2021:8816041.
252. Leung JM, Davenport M, Wolff MJ, Wiens KE, Abidi WM, Poles MA, et al. IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol.* 2014;7(1):124–33.
253. Schulz-Kuhnt A, Neurath MF, Wirtz S, Atreya I. Innate lymphoid cells as regulators of epithelial integrity: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *Front Med.* 2021;8:656745.

254. Mizoguchi A, Yano A, Himuro H, Ezaki Y, Sadanaga T, Mizoguchi E. Clinical importance of IL-22 cascade in IBD. *J Gastroenterol.* 2018;53(4):465–74.
255. Palmer G, Gabay C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(6):321–9.
256. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelman K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature.* 2014;513(7519):564–8.
257. Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, Möller S, Gangl S, Bachmann O, et al. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF α treatment. *Gut.* 2011;60(10):1345–53.
258. Ueno A, Jijon H, Chan R, Ford K, Hirota C, Kaplan GG, et al. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(12):2522–34.
259. Kałużna A, Olczyk P, Komosińska-Vassev K. The role of innate and adaptive immune cells in the pathogenesis and development of the inflammatory response in ulcerative colitis. *J Clin Med.* 2022;11(2):400.
260. Castro-Dopico T, Dennison TW, Ferdinand JR, Mathews RJ, Fleming A, Clift D, et al. Anti-commensal IgG drives intestinal inflammation and type 17 immunity in ulcerative colitis. *Immunity.* 2019;50(4):1099-1114.e10.
261. Castro-Dopico T, Clatworthy MR. IgG and Fc γ receptors in intestinal immunity and inflammation. *Front Immunol.* 2019;10:805.
262. Wang X, Zhu Y, Zhang M, Wang H, Jiang Y, Gao P. Ulcerative colitis is characterized by a decrease in regulatory B cells. *J Crohn's Colitis.* 2016;10(10):1212–23.
263. Rieder F, Karrasch T, Ben-Horin S, Schirbel A, Ehehalt R, Wehkamp J, et al. Results of the 2nd scientific workshop of the ECCO (III): basic mechanisms of intestinal healing. *J Crohn's Colitis.* 2012;6(3):373–5.
264. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):463–6.
265. Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Dis Mon.* 2019;65(12):100851.
266. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005;19(Suppl A):5A-36A.
267. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. *Br Med J.* 1955;2(4947):1041-8.

Bibliografia

268. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(3):501-23.
269. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987;317(26):1625-9.
270. Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol*. 2014;7(1):6-19.
271. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132(2):763-86.
272. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, et al. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2013;7(12):982-1018.
273. Pai RK, Jairath V, Van de Casteele N, Rieder F, Parker CE, Lauwers GY. The emerging role of histologic disease activity assessment in ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc*. 2018;88(6):887-98.
274. Punchard NA, Greenfield SM, Thompson RPH. Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid. *Mediators Inflamm*. 1992;1(3):151-65.
275. Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1-3):51-62.
276. Boal Carvalho P, Cotter J. Mucosal healing in ulcerative colitis: a comprehensive review. *Drugs*. 2017;77(2):159-73.
277. Römken TEH, Kampschreur MT, Drenth JPH, Van Oijen MGH, De Jong DJ. High mucosal healing rates in 5-ASA-treated ulcerative colitis patients: results of a meta-analysis of clinical trials. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(11):2190-8.
278. D'Haens G. Systematic review: second-generation vs. conventional corticosteroids for induction of remission in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;44(10):1018-29.
279. Ardizzone S, Maconi G, Russo A, Imbesi V, Colombo E, Porro GB. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut*. 2006;55(1):47-53.
280. Jharap B, Seinen ML, De Boer NKH, Van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, et al. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(9):1541-9.
281. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med*. 1994;330(26):1841-5.

282. Ogata H, Matsui T, Nakamura M, Iida M, Takazoe M, Suzuki Y, et al. A randomised dose finding study of oral tacrolimus (FK506) therapy in refractory ulcerative colitis. *Gut*. 2006;55(9):1255–62.
283. Ghoreschi K, Laurence A, O’Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228(1):273–87.
284. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, D’Haens GR, Vermeire S, Schreiber S, et al. Tofacitinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1723–36.
285. Ha C, Mathur J, Kornbluth A. Anti-TNF levels and anti-drug antibodies, immunosuppressants and clinical outcomes in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(4):497–505.
286. Ben-Horin S, Kopylov U, Chowers Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(1):24–30.
287. Almradi A, Hanzel J, Sedano R, Parker CE, Feagan BG, Ma C, et al. Clinical trials of IL-12/IL-23 inhibitors in inflammatory bowel disease. *BioDrugs*. 2020;34(6):713–21.
288. Wong U, Cross RK. Expert opinion on interleukin-12/23 and interleukin-23 antagonists as potential therapeutic options for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019;28(5):473–9.
289. Raine T, Verstockt B, Kopylov U, Karmiris K, Goldberg R, Atreya R, et al. ECCO topical review: refractory inflammatory bowel disease. *J Crohn’s Colitis*. 2021;15(10):1605–20.
290. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019;68(Suppl 3):s1–s106.
291. Lemmens B, Arijis I, Van Assche G, Sagaert X, Geboes K, Ferrante M, et al. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(6):1194–201.
292. Lowe SC, Sauk JS, Limketkai BN, Kwaan MR. Declining rates of surgery for inflammatory bowel disease in the era of biologic therapy. *J Gastrointest Surg*. 2020;25(1):211–9.
293. Mizoguchi E, Low D, Ezaki Y, Okada T. Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models. *Intest Res*. 2020;18(2):151–67.
294. Baydi Z, Limami Y, Khalki L, Zaid N, Naya A, Mtairag EM, et al. An update of research animal models of inflammatory bowel disease. *ScientificWorldJournal*. 2021;2021:7479540.
295. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18(4):279–88.

Bibliografia

296. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*. 1994;1(7):553–62.
297. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology*. 1994;107(6):1726–35.
298. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, et al. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest*. 2001;107(6):695–702.
299. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol*. 1998;161(10):5733–44.
300. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:718617.
301. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98:694–702.
302. Hoffmann M, Schwertassek U, Seydel A, Weber K, Falk W, Hauschildt S, et al. A refined and translationally relevant model of chronic DSS colitis in BALB/c mice. *Lab Anim*. 2018;52(3):240–52.
303. Dahlbäck B. Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S. *Biochem J*. 1983;209(3):847–56.
304. Blom AM, Nandakumar KS, Holmdahl R. C4b-binding protein (C4BP) inhibits development of experimental arthritis in mice. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(1):136–42.
305. Rodriguez W, Mold C, Marnell LL, Hutt J, Silverman GJ, Tran D, et al. Prevention and reversal of nephritis in MRL/lpr mice with a single injection of C-reactive protein. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):325–35.
306. Fakhouri F, De Jorge EG, Brune F, Azam P, Cook HT, Pickering MC. Treatment with human complement factor H rapidly reverses renal complement deposition in factor H-deficient mice. *Kidney Int*. 2010;78(3):279–86.
307. Schiffer L, Bethunaickan R, Ramanujam M, Huang W, Schiffer M, Tao H, et al. Activated renal macrophages are markers of disease onset and disease remission in lupus nephritis. *J Immunol*. 2008;180(3):1938–47.
308. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, Meconahey PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. 1978;148(5):1198–215.
309. Berthier CC, Bethunaickan R, Gonzalez-Rivera T, Nair V, Ramanujam M, Zhang W, et al. Cross-species transcriptional network analysis defines shared inflammatory responses in murine and human lupus nephritis. *J Immunol*. 2012;189(2):988–1001.

310. Bethunaickan R, Berthier CC, Zhang W, Kretzler M, Davidson A. Comparative transcriptional profiling of 3 murine models of SLE nephritis reveals both unique and shared regulatory networks. *PLoS One*. 2013;8(10):e77489.
311. Bethunaickan R, Berthier CC, Zhang W, Eksi R, Li HD, Guan Y, et al. Identification of stage-specific genes associated with lupus nephritis and response to remission induction in (NZB × NZW)F1 and NZM2410 mice. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):2246–58.
312. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: Correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(6):G1328–38.
313. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*. 2012;(60):3678.
314. Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinforma*. 2016;54:5.6.1-5.6.37.
315. Buffalo CZ, Bahn-Suh AJ, Hirakis SP, Biswas T, Amaro RE, Nizet V, et al. Conserved patterns hidden within group A Streptococcus M protein hypervariability recognize human C4b-binding protein. *Nat Microbiol*. 2016;1(11):16155.
316. Hofmeyer T, Schmelz S, Degiacomi MT, Dal Peraro M, Daneschdar M, Scrima A, et al. Arranged sevenfold: structural insights into the C-terminal oligomerization domain of human C4b-binding protein. *J Mol Biol*. 2013;425(8):1302–17.
317. Shen M, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci*. 2006;15(11):2507–24.
318. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: more and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci*. 2018;27(1):293–315.
319. Wu Z, Zhang Z, Lei Z, Lei P. CD14: biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;48:24–31.
320. Wu YW, Tang W, Zuo JP. Toll-like receptors: potential targets for lupus treatment. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(12):1395–407.
321. Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin Ther*. 2002;24(11):1720–40.
322. Sugisaki T, Takase S. Composition of immune deposits present in glomeruli of NZB/W F1 mice. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;61(3):296–308.
323. Kang S, Rogers JL, Monteith AJ, Jiang C, Schmitz J, Clarke SH, et al. Apoptotic debris accumulates on hematopoietic cells and promotes disease in murine and human systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2016;196:4030–9.

Bibliografia

324. Garrido-Mesa N, Utrilla P, Comalada M, Zorrilla P, Garrido-Mesa J, Zarzuelo A, et al. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(12):1891–900.
325. Garrido-Mesa N, Camuesco D, Arribas B, Comalada M, Bailón E, Cueto-Sola M, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of minocycline in experimental colitis involves both its immunomodulatory and antimicrobial properties. *Pharmacol Res.* 2011;63(4):308–19.
326. Huang CH, Hou YC, Pai MH, Yeh CL, Yeh SL. Dietary ω -6/ ω -3 polyunsaturated fatty acid ratios affect the homeostasis of Th/Treg cells in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Parenter Enter Nutr.* 2017;41(4):647–56.
327. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2003;124(5):1265–76.
328. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, et al. PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2006;55(9):1341–9.
329. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):329–42.
330. Puleston J, Cooper M, Murch S, Bid K, Makh S, Ashwood P, et al. A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21(2):109–20.
331. Sasaki S, Yoneyama H, Suzuki K, Suriki H, Aiba T, Watanabe S, et al. Blockade of CXCL10 protects mice from acute colitis and enhances crypt cell survival. *Eur J Immunol.* 2002;32(11):3197–205.
332. Wang YD, Yan PY. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2006;12(37):6050–3.
333. Soomro S, Venkateswaran S, Vanarsa K, Kharboutli M, Nidhi M, Susarla R, et al. Predicting disease course in ulcerative colitis using stool proteins identified through an aptamer-based screen. *Nat Commun.* 2021;12(1):3989.
334. Carlsen HS, Baekkevold ES, Johansen FE, Haraldsen G, Brandtzaeg P. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut.* 2002;51(3):364–71.
335. Hillarp A, Dahlbäck B. Novel Subunit in C4b-binding protein required for protein S binding. *J Biol Chem.* 1988;263(25):12759–64.
336. Hårdig Y, Dahlbäck B. The amino-terminal module of the C4b-binding protein beta-chain contains the protein S-binding site. *J Biol Chem.* 1996;271(34):20861–7.
337. Mohlin FC, Blom AM. Purification and functional characterization of C4b-binding protein (C4BP). *Methods Mol Biol.* 2014;1100:169–76.

338. Schreibelt G, Tel J, Sliepen KHEWJ, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(10):1573–82.
339. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(8):566–77.
340. Klarquist J, Zhou Z, Shen N, Janssen EM. Dendritic cells in systemic lupus erythematosus: from pathogenic players to therapeutic tools. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:5045248.
341. Fiore N, Castellano G, Blasi A, Capobianco C, Loverre A, Montinaro V, et al. Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Mol Immunol.* 2008;45(1):259–65.
342. Carreño LJ, Pacheco R, Gutierrez MA, Jacobelli S, Kalergis AM. Disease activity in systemic lupus erythematosus is associated with an altered expression of low-affinity Fcγ receptors and costimulatory molecules on dendritic cells. *Immunology.* 2009;128(3):334–41.
343. Decker P, Kötter I, Klein R, Berner B, Rammensee HG. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2006;45(9):1087–95.
344. Mozaffarian N, Wiedeman AE, Stevens AM. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology.* 2008;47(9):1335–41.
345. Ding D, Mehta H, McCune WJ, Kaplan MJ. Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2006;177(9):5878–89.
346. Henriques A, Inês L, Carvalheiro T, Couto M, Andrade Â, Pedreiro S, et al. Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2011;32(4):863–9.
347. Wardowska A, Smoleńska Z, Lisowska KA, Zdrojewski Z, Pikuła M. Dendritic cells' characteristics in patients with treated systemic lupus erythematosus. *Acta Biochim Pol.* 2020;67(3):417–29.
348. Fan Y, Liu B. Expression of Toll-like receptors in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Exp Ther Med.* 2015;9(4):1455–59.
349. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2005;129(1):50–65.
350. Bernardo D, Chaparro M, Gisbert JP. Human intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62(7):e1700931.

Bibliografia

351. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, et al. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1297–308.
352. Radwan P, Radwan-Kwiatek K, Tabarkiewicz J, Radej S, Rolinski J. Enhanced phenotypic and functional maturation of monocyte-derived dendritic cells from patients with active Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(6):695-703.
353. Ikeda Y, Akbar F, Matsui H, Onji M. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(7):841–50.
354. Ikeda Y, Akbar F, Matsui H, Onji M. Antigen-presenting dendritic cells in ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 2002;37(Suppl 14):53–5.
355. Kaewraemruan C, Ritprajak P, Hirankarn N. Dendritic cells as key players in systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020;38(4):225-32.
356. Crozat K, Guiton R, Williams M, Henri S, Baranek T, Schwartz-Cornil I, et al. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev*. 2010;234(1):177–98.
357. Miloud T, Hämmerling GJ, Garbi N. Review of murine dendritic cells: types, location, and development. *Methods Mol Biol*. 2010;595:21–42.
358. De Córdoba SR, Pérez-Blas M, Ramos-Ruiz R, Sánchez-Corral P, de Villena FPM, Rey-Campos J. The gene coding for the beta-chain of C4b-binding protein (C4BPB) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics*. 1994;21(3):501–9.
359. Santiago-Raber ML, Dunand-Sauthier I, Wu T, Li QZ, Uematsu S, Akira S, et al. Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun*. 2010;34(4):339–48.
360. Kazazian NH, Wang Y, Roussel-Queval A, Marcadet L, Chasson L, Laprie C, et al. Lupus autoimmunity and metabolic parameters are exacerbated upon high fat diet-induced obesity due to TLR7 signaling. *Front Immunol*. 2019;10:2015.
361. Celhar T, Hopkins R, Thornhill SI, De Magalhaes R, Hwang SH, Lee HY, et al. RNA sensing by conventional dendritic cells is central to the development of lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(45):E6195–204.
362. Murakami Y, Fukui R, Tanaka R, Motoi Y, Kanno A, Sato R, et al. Anti-TLR7 antibody protects against lupus nephritis in NZBWF1 mice by targeting B cells and patrolling monocytes. *Front Immunol*. 2021;12:777197.
363. Nakajima A, Azuma M, Kodera S, Nuriya S, Terashi A, Abe M, et al. Preferential dependence of autoantibody production in murine lupus on CD86 costimulatory molecule. *Eur J Immunol*. 1995;25(11):3060–9.

364. Kinoshita K, Tesch G, Schwarting A, Maron R, Sharpe AH, Kelley VR. Costimulation by B7-1 and B7-2 is required for autoimmune disease in MRL-Fas^{lpr} mice. *J Immunol.* 2000;164(11):6046–56.
365. Fritchen C, Kim HJ, Lightfoot RW. Studies of murine complement. *Arthritis Rheum.* 1980;23(8):904–10.
366. Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, Matis LA. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/W F1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(16):8563–8.
367. Bao L, Osawe I, Haas M, Quigg RJ. Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis. *J Immunol.* 2005;175(3):1947–55.
368. Bao L, Osawe I, Puri T, Lambris JD, Haas M, Quigg RJ. C5a promotes development of experimental lupus nephritis which can be blocked with a specific receptor antagonist. *Eur J Immunol.* 2005;35(8):2496–506.
369. Song H, He C, Knaak C, Guthridge JM, Holers VM, Tomlinson S. Complement receptor 2-mediated targeting of complement inhibitors to sites of complement activation. *J Clin Invest.* 2003;111(12):1875–85.
370. Bao L, Haas M, Kraus DM, Hack BK, Rakstang JK, Holers VM, et al. Administration of a soluble recombinant complement C3 inhibitor protects against renal disease in MRL/lpr mice. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(3):670–9.
371. Sekine H, Kinser TTH, Qiao F, Martinez E, Paulling E, Ruiz P, et al. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2011;63(4):1076–85.
372. Jacob CO, Pricop L, Putterman C, Koss MN, Liu Y, Kollaros M, et al. Paucity of clinical disease despite serological autoimmunity and kidney pathology in lupus-prone new zealand mixed 2328 mice deficient in BAFF. *J Immunol.* 2006;177(4):2671–80.
373. Ramanujam M, Wang X, Huang W, Liu Z, Schiffer L, Tao H, et al. Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest.* 2006;116(3):724–34.
374. Bergtold A, Gavhane A, D'Agati V, Madaio M, Clynes R. FcR-bearing myeloid cells are responsible for triggering murine lupus nephritis. *J Immunol.* 2006;177(10):7287–95.
375. Zampeli E, Klinman DM, Gershwin ME, Moutsopoulos HM. A comprehensive evaluation for the treatment of lupus nephritis. *J Autoimmun.* 2017;78:1–10.
376. Lourenço EV, Wong M, Hahn BH, Palma-Diaz MF, Skaggs BJ. Laquinimod delays and suppresses nephritis in lupus-prone mice and affects both myeloid and lymphoid immune cells. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(3):674–85.

Bibliografia

377. Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, Stirzaker RA, Gorman DJ, Grant RW, et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab.* 2014;19(5):821–35.
378. Kulak K, Westermark GT, Papac-Milicevic N, Renström E, Blom AM, King BC. The human serum protein C4b-binding protein inhibits pancreatic IAPP-induced inflammasome activation. *Diabetologia.* 2017;60(8):1522–33.
379. Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective. *Trends Mol Med.* 2017;23(7):615–35.
380. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol.* 2004;5(10):1061–8.
381. Miyagawa F, Tagaya Y, Ozato K, Horie K, Asada H. Inflammatory monocyte-derived dendritic cells mediate autoimmunity in murine model of systemic lupus erythematosus. *J Transl Autoimmun.* 2020;3:100060.
382. Miyagawa F, Tagaya Y, Ozato K, Asada H. Essential requirement for IFN regulatory factor 7 in autoantibody production but not development of nephritis in murine lupus. *J Immunol.* 2016;197(6):2167–76.
383. Heesters BA, van Megesen K, Tomris I, de Vries RP, Magri G, Spits H. Characterization of human fDCs reveals regulation of T cells and antigen presentation to B cells. *J Exp Med.* 2021;218(10):e20210790.
384. Schiffer L, Bethunaickan R, Ramanujam M, Huang W, Schiffer M, Tao H, et al. Activated renal macrophages are markers of disease onset and disease remission in lupus nephritis. *J Immunol.* 2008;180(3):1938–47.
385. Sang A, Zheng YY, Morel L. Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Mol Immunol.* 2014;62(2):329–38.
386. He DN, Chen WL, Long KX, Zhang X, Dong GF. Association of serum CXCL13 with intrarenal ectopic lymphoid tissue formation in lupus nephritis. *J Immunol Res.* 2016;2016:4832543.
387. Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, Klimatcheva E, Pandina T, Takahashi S, et al. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. *Mucosal Immunol.* 2014;7(5):1244–54.
388. Wu X, Guo J, Ding R, Lv B, Bi L. CXCL13 blockade attenuates lupus nephritis of MRL/lpr mice. *Acta Histochem.* 2015;117(8):732–7.
389. Carlsen HS, Baekkevold ES, Morton HC, Haraldsen G, Brandtzaeg P. Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood.* 2004;104(10):3021–7.

390. Vermi W, Facchetti F, Riboldi E, Heine H, Scutera S, Stornello S, et al. Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of *Bartonella henselae* B-rich granuloma. *Blood*. 2006;107(2):454–62.
391. Rupprecht TA, Kirschning CJ, Popp B, Kastenbauer S, Fingerle V, Pfister HW, et al. *Borrelia garinii* induces CXCL13 production in human monocytes through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2007;75(9):4351–6.
392. Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, Gretz N, Spieker T, Zeng-Brouwers J, et al. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4251–72.
393. Bellamri N, Viel R, Morzadec C, Lecureur V, Joannes A, de Latour B, et al. TNF- α and IL-10 control CXCL13 expression in human macrophages. *J Immunol*. 2020;204(9):2492–502.
394. Neyt K, Perros F, GeurtsvanKessel CH, Hammad H, Lambrecht BN. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2012;33(6):297–305.
395. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014;104:15.25.1–15.25.14.
396. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2017;12(7):1295–309.
397. Yang F, Wang A, Zeng X, Hou C, Liu H, Qiao S. *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions. *BMC Microbiol*. 2015;15:32.
398. Yin SJ, Yang HF, Tao Y, Wei SM, Li LH, Liu MJ, et al. Artesunate ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by protecting intestinal barrier and inhibiting inflammatory response. *Inflammation*. 2020;43(2):765–76.
399. Wang J, Zhang C, Guo C, Li X. Chitosan ameliorates DSS-induced ulcerative colitis mice by enhancing intestinal barrier function and improving microflora. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5751.
400. Tan Y, Zheng C. Effects of alpinetin on intestinal barrier function, inflammation and oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice. *Am J Med Sci*. 2018;355(4):377–86.
401. Annese V, Rogai F, Settesoldi A, Bagnoli S. PPARgamma in inflammatory bowel disease. *PPAR Res*. 2012;2012:620839.
402. Decara J, Rivera P, López-Gambero AJ, Serrano A, Pavón FJ, Baixeras E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: experimental targeting for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Front Pharmacol*. 2020;11:730.
403. Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1072:288–99.

Bibliografia

404. He LX, Wang JB, Sun B, Zhao J, Li L, Xu T, et al. Suppression of TNF- α and free radicals reduces systematic inflammatory and metabolic disorders: Radioprotective effects of ginseng oligopeptides on intestinal barrier function and antioxidant defense. *J Nutr Biochem*. 2017;40:53–61.
405. Thukral C, Cheifetz A, Peppercorn MA. Anti-tumour necrosis factor therapy for ulcerative colitis. *Drugs*. 2006;66(16):2059–65.
406. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519–31.
407. Cominelli F, Pizarro TT. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996;10(Suppl 2):49–53.
408. Tomasik P, Zając A, Fyderek K, Wędrychowicz A. Prognostic value of assessment of stool and serum IL-1 β , IL-1ra and IL-6 concentrations in children with active and inactive ulcerative colitis. *Arch Med Sci*. 2018;14(1):107-14.
409. Crispe IN. Hepatocytes as immunological agents. *J Immunol*. 2016;196(1):17–21.
410. Arredouani MS, Kasran A, Vanoirbeek JA, Berger FG, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology*. 2005;114(2):263–71.
411. Huntoon KM, Wang Y, Eppolito CA, Barbour KW, Berger FG, Shrikant PA, et al. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):170–81.
412. Lopetuso LR, Corbi M, Scaldaferrri F, Petito V, Graziani C, Castri F, et al. Characterization of mucosal cytokine profile in ulcerative colitis patients under conventional and anti-TNF- α treatment. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020;32(12):1527–32.
413. Kessel C, Lavric M, Weinhage T, Brueckner M, de Roock S, Däbritz J, et al. Serum biomarkers confirming stable remission in inflammatory bowel disease. *Sci Rep*. 2021;11(1):6690.
414. Theyab A, Algahtani M, Alsharif KF, Hawsawi YM, Alghamdi A, Alghamdi A, et al. New insight into the mechanism of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) that induces the mobilization of neutrophils. *Hematology*. 2021;26(1):628–36.
415. Johswich K, Martin M, Bleich A, Kracht M, Dittrich-Breiholz O, Gessner JE, et al. Role of the C5a receptor (C5aR) in acute and chronic dextran sulfate-induced models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(12):1812–23.
416. Chen G, Yang Y, Gao X, Dou Y, Wang H, Han G, et al. Blockade of complement activation product C5a activity using specific antibody attenuates intestinal damage in trinitrobenzene sulfonic acid induced model of colitis. *Lab Invest*. 2011;91(3):472–83.
417. Zhang J, Wang X, Xu L, Zhang Z, Wang F, Tang X. Investigation of potential genetic biomarkers and molecular mechanism of ulcerative colitis utilizing bioinformatics analysis. *Biomed Res Int*. 2020;2020:4921387.

418. Ranganathan P, Jayakumar C, Manicassamy S, Ramesh G. CXCR2 knockout mice are protected against DSS-colitis-induced acute kidney injury and inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(10):F1422–7.
419. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012;5(4):354–66.
420. Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*. 2022;19(2):177–91.
421. Li Y, Li N, Liu J, Wang T, Dong R, Ge D, et al. Gegen qinlian decoction alleviates experimental colitis and concurrent lung inflammation by inhibiting the recruitment of inflammatory myeloid cells and restoring microbial balance. *J Inflamm Res*. 2022;15:1273-91.
422. Kim ND, Luster AD. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol*. 2015;36(9):547–55.
423. Jakubowska K, Pryczynicz A, Iwanowicz P, Niewiński A, Maciorkowska E, Hapanowicz J, et al. Expressions of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:2456179.
424. Breynaert C, de Bruyn M, Arijis I, Cremer J, Martens E, Van Lommel L, et al. Genetic deletion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1/TIMP-1 alters inflammation and attenuates fibrosis in dextran sodium sulphate-induced murine models of colitis. *J Crohn's Colitis*. 2016;10(11):1336–50.
425. Sandborn WJ, Colombel JF, Ghosh S, Sands BE, Dryden G, Hébuterne X, et al. Eldelumab [anti-IP-10] induction therapy for ulcerative colitis: a randomised, placebo-controlled, phase 2b study. *J Crohn's Colitis*. 2016;10(4):418–28.
426. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
427. Zhang X, Wei L, Wang J, Qin Z, Wang J, Lu Y, et al. Suppression colitis and colitis-associated colon cancer by anti-S100a9 antibody in mice. *Front Immunol*. 2017;8:1774.
428. Park KT, Heida A, Van Rhee PF. Standardizing fecal calprotectin monitoring in asymptomatic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(9):E47.
429. Magro F, Lopes SI, Lopes J, Portela F, Cotter J, Lopes S, et al. Histological outcomes and predictive value of faecal markers in moderately to severely active ulcerative colitis patients receiving infliximab. *J Crohn's Colitis*. 2016;10(12):1407–16.
430. Guardiola J, Lobatón T, Rodríguez-Alonso L, Ruiz-Cerulla A, Arajol C, Loayza C, et al. Fecal level of calprotectin identifies histologic inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical and endoscopic remission. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(11):1865–70.

Bibliografia

431. Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity*. 2000;12(5):471–81.
432. McNamee EN, Rivera-Nieves J. Ectopic tertiary lymphoid tissue in inflammatory bowel disease: Protective or provocateur? *Front Immunol*. 2016;7:308.
433. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Mutations in α -chain of C4BP that selectively affect its factor I cofactor function. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43437–42.
434. Ermer D, Blom AM. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett*. 2016;169:82–92.
435. Villoutreix BO, Blom AM, Webb J, Dahlbäck B. The complement regulator C4b-binding protein analyzed by molecular modeling, bioinformatics and computer-aided experimental design. *Immunopharmacology*. 1999;42(1–3):121–34.
436. Hovingh ES, van den Broek B, Jongerius I. Hijacking complement regulatory proteins for bacterial immune evasion. *Front Microbiol*. 2016;7:2004.
437. Ermer D, Shaughnessy J, Joeris T, Kaplan J, Pang CJ, Kurt-Jones EA, et al. Virulence of group A streptococci is enhanced by human complement inhibitors. *PLOS Pathog*. 2015;11(7):e1005043.
438. Galimidi RP, Klein JS, Politzer MS, Bai S, Seaman MS, Nussenzweig MC, et al. Intra-spike crosslinking overcomes antibody evasion by HIV-1. *Cell*. 2015;160(3):433–46.
439. Bandlow V, Liese S, Lauster D, Ludwig K, Netz RR, Herrmann A, et al. Spatial screening of hemagglutinin on influenza A virus particles: sialyl-LacNAc displays on DNA and PEG scaffolds reveal the requirements for bivalency enhanced interactions with weak monovalent binders. *J Am Chem Soc*. 2017;139(45):16389–97.
440. Tonye Libyh M, Goossens D, Oudin S, Gupta N, Dervillez X, Juszcak G, et al. A recombinant human scFv anti-Rh(D) antibody with multiple valences using a C-terminal fragment of C4-binding protein. *Blood*. 1997;90(10):3978–83.
441. Christiansen D, Devaux P, Réveil B, Evlashev A, Horvat B, Lamy J, et al. Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. *J Virol*. 2000;74(10):4672–8.
442. Valldorf B, Fittler H, Deweid L, Ebenig A, Dickgiesser S, Sellmann C, et al. An apoptosis-inducing heptad that efficiently clusters death receptor 5. *Angew Chemie Int Ed*. 2016;55(16):5085–9.
443. Seguin-Devaux C, Plessier JM, Verschuere C, Masquelier C, Iserentant G, Fullana M, et al. FHR4-based immunoconjugates direct complement-dependent cytotoxicity and phagocytosis towards HER2-positive cancer cells. *Mol Oncol*. 2019;13(12):2531–53.
444. Kask L, Villoutreix BO, Steen M, Ramesh B, Dahlbäck B, Blom AM. Structural stability and heat-induced conformational change of two complement inhibitors: C4b-binding protein and factor H. *Protein Sci*. 2004;13(5):1356–64.

445. Sander J, Schmidt SV, Cirovic B, McGovern N, Papantonopoulou O, Hardt AL, et al. Cellular differentiation of human monocytes is regulated by time-dependent interleukin-4 signaling and the transcriptional regulator NCOR2. *Immunity*. 2017;47(6):1051-1066.e12.
446. Grosche L, Knippertz I, König C, Royzman D, Wild AB, Zinser E, et al. The CD83 molecule – an important immune checkpoint. *Front Immunol*. 2020;11:721.
447. Iberg CA, Hawiger D. Natural and induced tolerogenic dendritic cells. *J Immunol*. 2020;204(4):733–44.
448. Passeri L, Marta F, Bassi V, Gregori S. Tolerogenic dendritic cell-based approaches in autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8415.
449. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373–84.
450. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640–3.
451. Kikuchi-Taura A, Yura A, Tsuji S, Ohshima S, Kitatoube A, Shimizu T, et al. Monocyte CD64 expression as a novel biomarker for the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015;24(10):1076–80.
452. Zhang H, Liu L, Li L. Lentivirus-mediated knockdown of FcγRI (CD64) attenuated lupus nephritis via inhibition of NF-κB regulating NLRP3 inflammasome activation in MRL/lpr mice. *J Pharmacol Sci*. 2018;137(4):342–9.
453. Li Y, Lee PY, Sobel ES, Narain S, Satoh M, Segal MS, et al. Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R6.
454. Li Y, Lee PY, Kellner ES, Paulus M, Switanek J, Xu Y, et al. Monocyte surface expression of FcγRI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R90.
455. Koopman JJE, Rennke HG, Leatherwood C, Speyer CB, D'silva K, McMahon GM, et al. Renal deposits of complement factors as predictors of end-stage renal disease and death in patients with lupus nephritis. *Rheumatology*. 2020;59(12):3751–8.
456. Sterner RM, Hartono SP, Grande JP. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Clin Cell Immunol*. 2014;5(2):205.
457. Engman C, Garciafigueroa Y, Phillips BE, Trucco M, Giannoukakis N. Co-stimulation-impaired bone marrow-derived dendritic cells prevent dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Front Immunol*. 2018;9:894.
458. Popov I, Li M, Zheng X, San H, Zhang X, Ichim TE, et al. Preventing autoimmune arthritis using antigen-specific immature dendritic cells: a novel tolerogenic vaccine. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R141.

Bibliografia

459. Van Duivenvoorde LM, Han WGH, Bakker AM, Louis-Plence P, Charbonnier L-M, Apparailly F, et al. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol.* 2007;179(3):1506–15.
460. Jansen MAA, Spiering R, Ludwig IS, van Eden W, Hilkens CMU, Broere F. Matured tolerogenic dendritic cells effectively inhibit autoantigen specific CD4+ T cells in a murine arthritis model. *Front Immunol.* 2019;10:2068.
461. Phillips BE, Giannoukakis N, Trucco M. Dendritic cell mediated therapy for immunoregulation of type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2008;5(4):873–9.
462. Tai N, Yasuda H, Xiang Y, Zhang L, Rodriguez-Pinto D, Yokono K, et al. IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice. *Clin Immunol.* 2011;139(3):336–49.
463. Ferreira GB, Gysemans CA, Demengeot J, da Cunha JPMCM, Vanherwegen A-S, Overbergh L, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 promotes tolerogenic dendritic cells with functional migratory properties in NOD mice. *J Immunol.* 2014;192(9):4210–20.
464. Xie Z, Chen J, Zheng C, Wu J, Cheng Y, Zhu S, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. *Immunology.* 2017;152(3):414–24.
465. Derdelinckx J, Mansilla MJ, De Laere M, Lee WP, Navarro-Barriuso J, Wens I, et al. Clinical and immunological control of experimental autoimmune encephalomyelitis by tolerogenic dendritic cells loaded with MOG-encoding mRNA. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):167.
466. Horibe EK, Sacks J, Unadkat J, Raimondi G, Wang Z, Ikeguchi R, et al. Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion. *Transpl Immunol.* 2008;18(4):307–18.
467. Raimondi G, Sumpter TL, Matta BM, Pillai M, Corbitt N, Vodovotz Y, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition and alloantigen-specific regulatory T cells synergize to promote long-term graft survival in immunocompetent recipients. *J Immunol.* 2010;184(2):624–36.
468. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet.* 2020;395(10237):1627–39.
469. Kurochkina Y, Tikhonova M, Tyrinova T, Leplina O, Sizikov A, Sulutian A, et al. The safety and tolerability of intra-articular injection of tolerogenic dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis: the preliminary results. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(Suppl 2):966.2-967.

470. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):227–34.
471. Zubizarreta I, Flórez-Grau G, Vila G, Cabezón R, España C, Andorra M, et al. Immune tolerance in multiple sclerosis and neuromyelitis optica with peptide-loaded tolerogenic dendritic cells in a phase 1b trial. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(17):8463–70.
472. Willekens B, Presas-Rodríguez S, Mansilla MJ, Derdelinckx J, Lee WP, Nijs G, et al. Tolerogenic dendritic cell-based treatment for multiple sclerosis (MS): a harmonised study protocol for two phase I clinical trials comparing intradermal and intranodal cell administration. *BMJ Open*. 2019;9(9):e030309.
473. Jauregui-Amezaga A, Cabezón R, Ramírez-Morros A, España C, Rimola J, Bru C, et al. Intraperitoneal administration of autologous tolerogenic dendritic cells for refractory Crohn's disease: a phase I study. *J Crohn's Colitis*. 2015;9(12):1071–8.
474. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):265–77.
475. Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through education: How tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Front Immunol*. 2017;8:1764.
476. Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Ramnoruth N, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med*. 2015;7(290):290ra87.
477. Ten Brinke A, Hilkens CMU, Cools N, Geissler EK, Hutchinson JA, Lombardi G, et al. Clinical use of tolerogenic dendritic cells-harmonization approach in european collaborative effort. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:471719.
478. Ten Brinke A, Martinez-Llordella M, Cools N, Hilkens CMU, Van Ham SM, Sawitzki B, et al. Ways forward for tolerance-inducing cellular therapies- An afactt perspective. *Front Immunol*. 2019;10:181.
479. Lord P, Spiering R, Aguillon JC, Anderson AE, Appel S, Benitez-Ribas D, et al. Minimum information about tolerogenic antigen-presenting cells (MITAP): a first step towards reproducibility and standardisation of cellular therapies. *PeerJ*. 2016;4:e2300.
480. Mansilla MJ, Sellès-Moreno C, Fàbregas-Puig S, Amoedo J, Navarro-Barriuso J, Teniente-Serra A, et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(3):222–30.
481. Mansilla MJ, Contreras-Cardone R, Navarro-Barriuso J, Cools N, Berneman Z, Ramo-Tello C, et al. Cryopreserved vitamin D3-tolerogenic dendritic cells pulsed with autoantigens as a potential therapy for multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):113.

Bibliografia

482. Funda DP, Goliáš J, Hudcovic T, Kozáková H, Špišek R, Palová-Jelinková L. Antigen loading (e.g., glutamic acid decarboxylase 65) of tolerogenic DCs (tolDCs) reduces their capacity to prevent diabetes in the non-obese diabetes (NOD)-severe combined immunodeficiency model of adoptive cotransfer of diabetes as well as in NOD mice. *Front Immunol.* 2018;9:290.
483. Riedhammer C, Weissert R. Antigen presentation, autoantigens, and immune regulation in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2015;6:322.
484. Voigtländer C, Rössner S, Cierpka E, Theiner G, Wiethe C, Menges M, et al. Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and after subcutaneous injection in vivo which converts their tolerogenicity into immunogenicity. *J Immunother.* 2006;29(4):407–15.
485. Lim DS, Kang MS, Jeong JA, Bae YS. Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic when inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice. *Eur J Immunol.* 2009;39(5):1334–43.
486. Phillips BE, Garciafigueroa Y, Trucco M, Giannoukakis N. Clinical tolerogenic dendritic cells: exploring therapeutic impact on human autoimmune disease. *Front Immunol.* 2017;8:1279.
487. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol.* 2007;178(11):7018–31.
488. Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol.* 2005;62(1):45–54.
489. Tostanoski LH, Gosselin EA, Jewell CM. Engineering tolerance using biomaterials to target and control antigen presenting cells. *Discov Med.* 2016;21(117):403-10.
490. LaMothe RA, Kolte PN, Vo T, Ferrari JD, Gelsinger TC, Wong J, et al. Tolerogenic nanoparticles induce antigen-specific regulatory T cells and provide therapeutic efficacy and transferrable tolerance against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Immunol.* 2018;9:281.
491. Rodriguez-Fernandez S, Pujol-Autonell I, Brioso F, Perna-Barrull D, Cano-Sarabia M, Garcia-Jimeno S, et al. Phosphatidylserine-liposomes promote tolerogenic features on dendritic cells in human type 1 diabetes by apoptotic mimicry. *Front Immunol.* 2018;9:253.
492. Dhodapkar MV, Sznoj M, Zhao B, Wang D, Carvajal RD, Keohan ML, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med.* 2014;6(232):232ra51.

493. Klechevsky E, Flamar AL, Cao Y, Blanck JP, Liu M, O'Bar A, et al. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood*. 2010;116(10):1685–97.
494. Meyer-Wentrup F, Cambi A, Joosten B, Looman MW, Jolanda I, De Vries M, et al. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol*. 2009;85(3):518–25.
495. Cruz LJ, Rosalia RA, Kleinovink JW, Rueda F, Löwik CWGM, Ossendorp F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8+ T cell response: a comparative study. *J Control Release*. 2014;192:209–18.
496. Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(5):560–5.
497. Schinnerling K, García-González P, Aguilón JC. Gene expression profiling of human monocyte-derived dendritic cells - Searching for molecular regulators of tolerogenicity. *Front Immunol*. 2015;6:528.
498. García-González PA, Schinnerling K, Sepúlveda-Gutiérrez A, Maggi J, Mehdi AM, Nel HJ, et al. Dexamethasone and monophosphoryl lipid a induce a distinctive profile on monocyte-derived dendritic cells through transcriptional modulation of genes associated with essential processes of the immune response. *Front Immunol*. 2017;8:1350.

ANNEXES

Taula A1. Llistat dels gens rellevants en el LES inclosos en el *TaqMan Low Density Array* customitzat.

Símbol gènic	Assay ID	UniGene ID	Nom del gen (tots en anglès)
Acad8	Mm00482266_m1	Mm.289244	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8
Ace	Mm00802048_m1	Mm.754	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
Acs1	Mm00484217_m1	Mm.210323	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
Acs3	Mm01255804_m1	Mm.276016	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
Actr3	Mm02342769_g1	Mm.183102	ARP3 actin-related protein 3
Ada	Mm00545720_m1	Mm.388	adenosine deaminase
Adh1	Mm00507711_m1	Mm.2409	alcohol dehydrogenase 1 (class I)
Adh7	Mm00507750_m1	Mm.8473	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
Adhfe1	Mm00613830_m1	Mm.28514	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1
Adsl	Mm00507759_m1	Mm.38151	adenylosuccinate lyase
Agt	Mm00599662_m1	Mm.301626	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
Ahcyl1	Mm00461101_m1	Mm.220328	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1
Ahcyl2	Mm00619649_m1	Mm.210899	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2
Aifm1	Mm00442540_m1	Mm.240434	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1
Aim2	Mm01295719_m1	Mm.131453	absent in melanoma 2
Akr1a1	Mm00480608_m1	Mm.30085	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)
Aldh2	Mm00477463_m1	Mm.284446	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
Aldh3a2	Mm00839320_m1	Mm.398221	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2
Aldh3b1	Mm00550698_m1	Mm.109341	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1
Aldh4a1	Mm00615268_m1	Mm.273571	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1
Aldh6a1	Mm00506227_m1	Mm.247510	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1
Aldh7a1	Mm00519645_m1	Mm.30250	aldehyde dehydrogenase family 7, member A1
Aldh9a1	Mm00480240_m1	Mm.292539	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1
Apoc3	Mm00445670_m1	Mm.390161	apolipoprotein C-III
Apoe	Mm01307193_g1	Mm.305152	apolipoprotein E
Arf6	Mm00500208_s1	Mm.27308	ADP-ribosylation factor 6
Arg1	Mm00475988_m1	Mm.154144	arginase, liver
Arg2	Mm00477592_m1	Mm.3506	arginase type II
Arpc1b	Mm00834862_m1	Mm.30010	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B
Arpc2	Mm01254383_m1	Mm.337038	actin related protein 2/3 complex, subunit 2
Arpc3	Mm01199871_m1	Mm.275942	actin related protein 2/3 complex, subunit 3
Arpc5	Mm04208715_m1	Mm.288974	actin related protein 2/3 complex, subunit 5
Atf4	Mm00515325_g1	Mm.641	activating transcription factor 4
Atp5b	Mm00443967_g1	Mm.238973	ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit
Atp5f1	Mm01296543_g1	Mm.251152	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit B1
Atp5g3	Mm01334541_g1	Mm.2966	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3 (subunit 9)
Auh	Mm00479363_m1	Mm.252034	AU RNA binding protein/enoyl-coenzyme A hydratase

B2m	Mm00437762_m1	Mm.163	beta-2 microglobulin
Batf3	Mm01318274_m1	Mm.6922	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3
Bckdha	Mm00476112_m1	Mm.25848	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
Bckdhb	Mm01177077_m1	Mm.12819	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide
Blk	Mm00432077_m1	Mm.3962	B lymphoid kinase
Btk	Mm00442712_m1	Mm.4475	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
C1qa	Mm00432142_m1	Mm.439957	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide
C1qb	Mm01179619_m1	Mm.2570	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
C1qc	Mm00776126_m1	Mm.439732	complement component 1, q subcomponent, C chain
C1ra	Mm04206253_g1	Mm.333375	complement component 1, r subcomponent A
C1s1	Mm00663210_mH	Mm.219527	complement component 1, s subcomponent 1
C3	Mm00437838_m1	Mm.19131	complement component 3
C3ar1	Mm02620006_s1	Mm.2408	complement component 3a receptor 1
C4bp	Mm00432150_m1	Mm.306720	complement component 4 binding protein
C6	Mm00489521_m1	Mm.20247	complement component 6
C8a	Mm00521627_m1	Mm.197638	complement component 8, alpha polypeptide
C9	Mm00442739_m1	Mm.29095	complement component 9
Casp1	Mm00438023_m1	Mm.1051	caspase 1
Casp3	Mm01195085_m1	Mm.34405	caspase 3
Cat	Mm00437992_m1	Mm.4215	catalase
Cbs	Mm00460654_m1	Mm.206417	cystathionine beta-synthase
Ccl2	Mm00441242_m1	Mm.290320	chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl5	Mm01302427_m1	Mm.284248	chemokine (C-C motif) ligand 5
Ccl9	Mm00441260_m1	Mm.416125	chemokine (C-C motif) ligand 9
Ccr1	Mm00438260_s1	Mm.274927	chemokine (C-C motif) receptor 1
Ccr2	Mm00438270_m1	Mm.6272	chemokine (C-C motif) receptor 2
Ccr5	Mm01963251_s1	Mm.14302	chemokine (C-C motif) receptor 5
Ccr6	Mm99999114_s1	Mm.8007	chemokine (C-C motif) receptor 6
Ccr7	Mm01301785_m1	Mm.2932	chemokine (C-C motif) receptor 7
Ccs	Mm00444148_m1	Mm.434411	copper chaperone for superoxide dismutase
Cd14	Mm00438094_g1	Mm.3460	CD14 antigen
Cd19	Mm00515420_m1	Mm.4360	CD19 antigen
Cd1d1	Mm00783541_s1	Mm.1894	CD1d1 antigen
Cd207	Mm00523545_m1	Mm.136079	CD207 antigen
Cd22	Mm00515432_m1	Mm.260994	CD22 antigen
Cd274	Mm00452054_m1	Mm.245363	CD274 antigen
Cd276	Mm00506020_m1	Mm.5356	CD276 antigen
Cd28	Mm00483137_m1	Mm.255003	CD28 antigen
Cd300lb	Mm01701741_m1	Mm.185355	CD300 antigen like family member B
Cd3d	Mm00442746_m1	Mm.4527	CD3 antigen, delta polypeptide
Cd3g	Mm00438095_m1	Mm.335106	CD3 antigen, gamma polypeptide
Cd40	Mm00441891_m1	Mm.271833	CD40 antigen
Cd40lg	Mm00441911_m1	Mm.4861	CD40 ligand
Cd48	Mm00455932_m1	Mm.1738	CD48 antigen
Cd5	Mm00432417_m1	Mm.779	CD5 antigen

Cd74	Mm00658576_m1	Mm.439737	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
Cd79b	Mm00434143_m1	Mm.2987	CD79B antigen
Cd80	Mm00711660_m1	Mm.89474	CD80 antigen
Cd83	Mm00486868_m1	Mm.57175	CD83 antigen
Cd86	Mm00444543_m1	Mm.1452	CD86 antigen
Cdt1	Mm00466006_m1	Mm.21873	chromatin licensing and DNA replication factor 1
Cebpb	Mm00843434_s1	Mm.439656	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
Cfb	Mm00433918_g1	Mm.653	complement factor B
Cfh	Mm01299248_m1	Mm.8655	complement component factor h
Cfi	Mm00432470_m1	Mm.117180	complement component factor i
Chek2	Mm00443839_m1	Mm.279308	checkpoint kinase 2
Chga	Mm00514341_m1	Mm.4137	chromogranin A
Cldn1	Mm00516701_m1	Mm.289441	claudin 1
Cldn7	Mm00516817_m1	Mm.281896	claudin 7
Clec10a	Mm00546125_g1	Mm.252405	C-type lectin domain family 10, member A
Clec4n	Mm00490934_m1	Mm.271782	C-type lectin domain family 4, member n
Clec7a	Mm01183349_m1	Mm.239516	C-type lectin domain family 7, member a
Clu	Mm01197002_m1	Mm.200608	clusterin
Col18a1	Mm00487131_m1	Mm.4352	collagen, type XVIII, alpha 1
Col1a1	Mm00801666_g1	Mm.277735	collagen, type I, alpha 1
Col1a2	Mm00483888_m1	Mm.277792	collagen, type I, alpha 2
Col3a1	Mm01254476_m1	Mm.249555	collagen, type III, alpha 1
Col4a1	Mm01210125_m1	Mm.738	collagen, type IV, alpha 1
Cox11	Mm01615963_g1	Mm.151940	cytochrome c oxidase assembly protein 11
Cox15	Mm00523096_m1	Mm.248237	cytochrome c oxidase assembly protein 15
Cox5a	Mm01176957_g1	Mm.273403	cytochrome c oxidase subunit Va
Cox5b	Mm00833840_g1	Mm.180182	cytochrome c oxidase subunit Vb
Cox6a1	Mm01612194_m1	Mm.43415	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1
Cox6b1	Mm00824357_m1	Mm.400	cytochrome c oxidase, subunit VIb polypeptide 1
Cox8a	Mm02342396_g1	Mm.14022	cytochrome c oxidase subunit VIIIa
Cpeb1	Mm01314928_m1	Mm.273122	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
Csf1	Mm00432686_m1	Mm.795	colony stimulating factor 1 (macrophage)
Csf1r	Mm01266652_m1	Mm.22574	colony stimulating factor 1 receptor
Csf2rb	Mm00655745_m1	Mm.235324	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
Cst7	Mm00438349_m1	Mm.12965	cystatin F (leukocystatin)
Ctgf	Mm01192932_g1	Mm.390287	connective tissue growth factor
Ctla4	Mm00486849_m1	Mm.390	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Ctss	Mm01255859_m1	Mm.3619	cathepsin S
Cx3cl1	Mm00436454_m1	Mm.103711	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Cx3cr1	Mm02620111_s1	Mm.44065	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
Cxcl1	Mm04207460_m1	Mm.21013	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Cxcl10	Mm00445235_m1	Mm.877	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Cxcl11	Mm00444662_m1	Mm.131723	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
Cxcl13	Mm04214185_s1	Mm.10116	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Cxcl16	Mm00469712_m1	Mm.425692	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Cxcl2	Mm00436450_m1	Mm.4979	chemokine (C-X-C motif) ligand 2

Cxcl9	Mm00434946_m1	Mm.766	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Cxcr4	Mm01996749_s1	Mm.1401	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cxcr6	Mm02620517_s1	Mm.124289	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
Cyc1	Mm00470540_m1	Mm.29196	cytochrome c-1
Dbf4	Mm01324087_m1	Mm.292470	DBF4 homolog (S. cerevisiae)
Ddr1	Mm01273496_m1	Mm.5021	discoidin domain receptor family, member 1
Dhrs4	Mm00472717_m1	Mm.27427	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4
Dld	Mm00432831_m1	Mm.3131	dihydroliipoamide dehydrogenase
Dnaja1	Mm00787254_s1	Mm.27897	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
Egln3	Mm00472200_m1	Mm.133037	egl-9 family hypoxia-inducible factor 3
Eng	Mm00468256_m1	Mm.225297	endoglin
Ep300	Mm00625535_m1	Mm.258397	E1A binding protein p300
Epas1	Mm01236112_m1	Mm.1415	endothelial PAS domain protein 1
Ephx2	Mm01313813_m1	Mm.15295	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
Ereg	Mm00514794_m1	Mm.4791	epiregulin
F3	Mm00438853_m1	Mm.273188	coagulation factor III
Fasl	Mm00438864_m1	Mm.3355	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Fcer1g	Mm02343757_m1	Mm.22673	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide
Fcgr1	Mm00438874_m1	Mm.150	Fc receptor, IgG, high affinity I
Fcgr3	Mm00438882_m1	Mm.22119	Fc receptor, IgG, low affinity III
Fcgr4	Mm00519988_m1	Mm.251254	Fc receptor, IgG, low affinity IV
Fga	Mm00802584_m1	Mm.88793	fibrinogen alpha chain
Fgb	Mm00805336_m1	Mm.30063	fibrinogen beta chain
Fgg	Mm00513575_m1	Mm.16422	fibrinogen gamma chain
Fli1	Mm00484410_m1	Mm.258908	Friend leukemia integration 1
Fmo1	Mm00515795_m1	Mm.976	flavin containing monooxygenase 1
Fmo2	Mm00490159_m1	Mm.10929	flavin containing monooxygenase 2
Fmo4	Mm00467393_m1	Mm.155164	flavin containing monooxygenase 4
Fn1	Mm01256744_m1	Mm.193099	fibronectin 1
Fos	Mm00487425_m1	Mm.246513	FBJ osteosarcoma oncogene
Foxp3	Mm00475162_m1	Mm.182291	forkhead box P3
Fyn	Mm00433373_m1	Mm.4848	Fyn proto-oncogene
Got1	Mm01195792_g1	Mm.19039	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble
GpnmB	Mm01328587_m1	Mm.302602	glycoprotein (transmembrane) nmb
Gss	Mm00515065_m1	Mm.252316	glutathione synthetase
Gsto1	Mm00599866_m1	Mm.378931	glutathione S-transferase omega 1
Havcr1	Mm00506686_m1	Mm.17771	hepatitis A virus cellular receptor 1
Hck	Mm01241463_m1	Mm.715	hemopoietic cell kinase
Hmox1	Mm00516005_m1	Mm.276389	heme oxygenase 1
Hnf4a	Mm01247712_m1	Mm.202383	hepatic nuclear factor 4, alpha
Hspe1	Mm00434083_m1	Mm.215667	heat shock protein 1 (chaperonin 10)
Icam1	Mm00516023_m1	Mm.435508	intercellular adhesion molecule 1
Icos	Mm00497600_m1	Mm.42044	inducible T cell co-stimulator
Id1	Mm00775963_g1	Mm.444	inhibitor of DNA binding 1
Idh1	Mm00516030_m1	Mm.9925	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
Idh3a	Mm00499674_m1	Mm.279195	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
Idh3b	Mm00504589_m1	Mm.29590	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta

ldh3g	Mm00599686_g1	Mm.14825	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD ⁺), gamma
lfi202b	Mm00839397_m1	Mm.218770	interferon activated gene 202B
lfi44	Mm00505670_m1	Mm.30756	interferon-induced protein 44
lfih1	Mm00459183_m1	Mm.136224	interferon induced with helicase C domain 1
lfng	Mm01168134_m1	Mm.240327	interferon gamma
lgfbp1	Mm00515154_m1	Mm.21300	insulin-like growth factor binding protein 1
lgfbp6	Mm00599696_m1	Mm.358609	insulin-like growth factor binding protein 6
lkbke	Mm00444862_m1	Mm.386783	inhibitor of kappaB kinase epsilon
lkzf1	Mm01187882_m1	Mm.103545	IKAROS family zinc finger 1
Il10	Mm00439614_m1	Mm.874	interleukin 10
Il10ra	Mm00434151_m1	Mm.379327	interleukin 10 receptor, alpha
Il12a	Mm00434165_m1	Mm.103783	interleukin 12a
Il12b	Mm00434174_m1	Mm.239707	interleukin 12b
Il17a	Mm00439618_m1	Mm.5419	interleukin 17A
Il18	Mm00434225_m1	Mm.1410	interleukin 18
Il1b	Mm00434228_m1	Mm.222830	interleukin 1 beta
Il1f6	Mm00457645_m1	Mm.133095	interleukin 1 family, member 6
Il1r2	Mm00439629_m1	Mm.1349	interleukin 1 receptor, type II
Il23a	Mm01160011_g1	Mm.125482	interleukin 23, alpha subunit p19
Il27	Mm00461162_m1	Mm.222632	interleukin 27
Il27ra	Mm00497259_m1	Mm.38386	interleukin 27 receptor, alpha
Il2rg	Mm00442885_m1	Mm.2923	interleukin 2 receptor, gamma chain
Il33	Mm00505403_m1	Mm.182359	interleukin 33
Il4	Mm00445259_m1	Mm.276360	interleukin 4
Il7r	Mm00434295_m1	Mm.389	interleukin 7 receptor
Inpp5d	Mm00494987_m1	Mm.15105	inositol polyphosphate-5-phosphatase D
Irak1	Mm01193538_m1	Mm.38241	interleukin-1 receptor-associated kinase 1
Irf1	Mm01288580_m1	Mm.105218	interferon regulatory factor 1
Irf4	Mm00516431_m1	Mm.4677	interferon regulatory factor 4
Irf5	Mm00496477_m1	Mm.6479	interferon regulatory factor 5
Irf7	Mm00516793_g1	Mm.3233	interferon regulatory factor 7
Irf8	Mm00492567_m1	Mm.334861	interferon regulatory factor 8
Irf9	Mm00492679_m1	Mm.2032	interferon regulatory factor 9
Itga4	Mm01277951_m1	Mm.31903	integrin alpha 4
Itgam	Mm00434455_m1	Mm.262106	integrin alpha M
Itgb2	Mm00434513_m1	Mm.1137	integrin beta 2
Jak3	Mm00439973_m1	Mm.249645	Janus kinase 3
Jun	Mm00495062_s1	Mm.275071	jun proto-oncogene
Klk11	Mm00480210_g1	Mm.154276	kallikrein related-peptidase 11
Klkb1	Mm00434658_m1	Mm.482691	kallikrein B, plasma 1
Lat	Mm00456761_m1	Mm.10280	linker for activation of T cells
Lck	Mm00802897_m1	Mm.293753	lymphocyte protein tyrosine kinase
Lcp2	Mm01187570_m1	Mm.265350	lymphocyte cytosolic protein 2
Lrrk2	Mm00481934_m1	Mm.37558	leucine-rich repeat kinase 2
Ltb	Mm00434774_g1	Mm.1715	lymphotoxin B
Ly96	Mm01227593_m1	Mm.116844	lymphocyte antigen 96
Lyn	Mm01217488_m1	Mm.317331	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog

Maob	Mm00555412_m1	Mm.241656	monoamine oxidase B
Map3k1	Mm00803707_m1	Mm.15918	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
Map3k3	Mm00803725_m1	Mm.27041	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
Map3k8	Mm00432637_m1	Mm.3275	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
Mapk9	Mm00444239_m1	Mm.68933	mitogen-activated protein kinase 9
Mat2b	Mm00506137_m1	Mm.293771	methionine adenosyltransferase II, beta
Mmp2	Mm00439498_m1	Mm.29564	matrix metalloproteinase 2
Mmp9	Mm00442991_m1	Mm.4406	matrix metalloproteinase 9
Mpo	Mm01298424_m1	Mm.4668	myeloperoxidase
Ms4a1	Mm00545909_m1	Mm.4046	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
Msr1	Mm00446214_m1	Mm.239291	macrophage scavenger receptor 1
Myl9	Mm01251442_m1	Mm.271770	myosin, light polypeptide 9, regulatory
Ncf1	Mm00447921_m1	Mm.425296	neutrophil cytosolic factor 1
Ndrp2	Mm00443481_g1	Mm.26722	N-myc downstream regulated gene 2
Ndufa10	Mm00600325_m1	Mm.248778	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10
Ndufa3	Mm01329704_g1	Mm.17851	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3
Ndufa8	Mm00503351_m1	Mm.19834	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8
Ndufa9	Mm00481216_m1	Mm.29939	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9
Ndufaf1	Mm00452828_m1	Mm.5390	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 1
Ndufb10	Mm01300078_m1	Mm.1129	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10
Ndufb2	Mm01157852_m1	Mm.29415	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2
Ndufb5	Mm00452592_m1	Mm.28058	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5
Ndufb6	Mm01208591_g1	Mm.1103	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6
Ndufs1	Mm00523640_m1	Mm.290791	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1
Ndufs5	Mm02600127_g1	Mm.42805	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5
Ndufs7	Mm01144210_m1	Mm.28712	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
Nfatc3	Mm01249200_m1	Mm.383185	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 3
Nfkb2	Mm00479810_g1	Mm.102365	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100
Nfkbie	Mm01269649_m1	Mm.57043	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, epsilon
Nisch	Mm00452152_m1	Mm.298728	nischarin
Nlrp3	Mm00840904_m1	Mm.54174	NLR family, pyrin domain containing 3
Nox4	Mm00479246_m1	Mm.31748	NADPH oxidase 4
Npy	Mm03048253_m1	Mm.154796	neuropeptide Y
Osmr	Mm01307326_m1	Mm.10760	oncostatin M receptor
Park7	Mm00498538_m1	Mm.277349	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7
Pcca	Mm00454899_m1	Mm.23876	propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide
Pccb	Mm00452663_m1	Mm.335385	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
Pdcd1lg2	Mm00451734_m1	Mm.116737	programmed cell death 1 ligand 2
Pdgfrb	Mm00435546_m1	Mm.4146	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
Pdha1	Mm00468675_m1	Mm.34775	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
Pik3c2g	Mm00440781_m1	Mm.333471	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide
Pik3cg	Mm00445038_m1	Mm.101369	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide

Pik3r5	Mm00805206_m1	Mm.244960	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101
Pipox	Mm00477190_m1	Mm.8543	pipecolic acid oxidase
Pla2g4a	Mm00447040_m1	Mm.4186	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
Pla2g7	Mm00479105_m1	Mm.9277	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
Pla2r1	Mm00476896_m1	Mm.5092	phospholipase A2 receptor 1
Plau	Mm01274460_g1	Mm.4183	plasminogen activator, urokinase
Plcd4	Mm00455768_m1	Mm.290731	phospholipase C, delta 4
Plce1	Mm00457691_m1	Mm.34031	phospholipase C, epsilon 1
Pld4	Mm00626861_m1	Mm.203915	phospholipase D family, member 4
Plekha2	Mm00504233_m1	Mm.261122	pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2
Pnmt	Mm00476993_m1	Mm.57030	phenylethanolamine-N-methyltransferase
Por	Mm00435876_m1	Mm.3863	P450 (cytochrome) oxidoreductase
Ppara	Mm00440939_m1	Mm.212789	peroxisome proliferator activated receptor alpha
Ppm1l	Mm00618786_m1	Mm.40577	protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like
Prdx3	Mm00545848_m1	Mm.29821	peroxiredoxin 3
Prdx5	Mm00465365_m1	Mm.279782	peroxiredoxin 5
Prkcb	Mm00435749_m1	Mm.207496	protein kinase C, beta
Prkcz	Mm00776345_g1	Mm.28561	protein kinase C, zeta
Pros1	Mm01343426_m1	Mm.127156	protein S (alpha)
Prtn3	Mm00478323_m1	Mm.2364	proteinase 3
Psmb8	Mm01278979_m1	Mm.180191	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
Psmb9	Mm00479004_m1	Mm.390983	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)
Ptgs2	Mm00478374_m1	Mm.292547	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Ptpn22	Mm00501246_m1	Mm.395	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)
Ptpn6	Mm00469153_m1	Mm.271799	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
Ptprc	Mm01293577_m1	Mm.391573	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Ptx3	Mm00477268_m1	Mm.276776	pentraxin related gene
Pycard	Mm00445747_g1	Mm.24163	PYD and CARD domain containing
Rac2	Mm00485472_m1	Mm.1972	RAS-related C3 botulinum substrate 2
Rad23a	Mm00436249_g1	Mm.255539	RAD23a homolog (S. cerevisiae)
Rdh14	Mm00502743_m1	Mm.119343	retinol dehydrogenase 14 (all-trans and 9-cis)
Rela	Mm00501346_m1	Mm.249966	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Relb	Mm00485664_m1	Mm.1741	avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B
Rnase1	Mm00726747_s1	Mm.235538	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)
Robo1	Mm00803879_m1	Mm.310772	roundabout homolog 1 (Drosophila)
S100a8	Mm00496696_g1	Mm.21567	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Saa1	Mm00656927_g1	Mm.148800	serum amyloid A 1
Sardh	Mm00454657_m1	Mm.278467	sarcosine dehydrogenase
Scd1	Mm00772290_m1	Mm.267377	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
Sdha	Mm01352366_m1	Mm.158231	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
Serpina1a	Mm02748447_g1	Mm.439692	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A

Serpina1c;Serpina1a	Mm04207709_gH	Mm.439692	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1C
Serpina1d	Mm00842094_mH	Mm.439695	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1D
Serpina1d;Serpina1a1b	Mm04207706_gH	Mm.439692	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1B
Serpina1e	Mm00833655_m1	Mm.312593	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1E
Serpina6	Mm00432327_m1	Mm.290079	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6
Serpine1	Mm00435860_m1	Mm.250422	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Serping1	Mm00437834_m1	Mm.38888	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1
Sh3bp2	Mm00449397_m1	Mm.5012	SH3-domain binding protein 2
Sigirr	Mm01275624_g1	Mm.38017	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
Slc2a4	Mm01245502_m1	Mm.10661	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
Socs3	Mm00545913_s1	Mm.3468	suppressor of cytokine signaling 3
Sod2	Mm01313000_m1	Mm.290876	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Sod3	Mm01213380_s1	Mm.2407	superoxide dismutase 3, extracellular
Sord	Mm00455377_g1	Mm.371580	sorbitol dehydrogenase
Spi1	Mm00488142_m1	Mm.1302	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene
Spn	Mm01164549_m1	Mm.283714	sialoporphin
Spp1	Mm00436767_m1	Mm.288474	secreted phosphoprotein 1
Srr	Mm01246014_m1	Mm.131443	serine racemase
Stat1	Mm00439531_m1	Mm.277406	signal transducer and activator of transcription 1
Stat3	Mm01219775_m1	Mm.249934	signal transducer and activator of transcription 3
Stat4	Mm00448890_m1	Mm.1550	signal transducer and activator of transcription 4
Suox	Mm00620388_g1	Mm.23352	sulfite oxidase
Surf1	Mm00489041_g1	Mm.347512	surfeit gene 1
Syk	Mm01333032_m1	Mm.375031	spleen tyrosine kinase
Tap1	Mm00443188_m1	Mm.482076	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
Tap2	Mm01277033_m1	Mm.14814	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
Tapbp	Mm00493417_m1	Mm.154457	TAP binding protein
Tgfb1	Mm01178820_m1	Mm.248380	transforming growth factor, beta 1
Tgfb1r1	Mm00436964_m1	Mm.197552	transforming growth factor, beta receptor I
Thbs2	Mm01279240_m1	Mm.26688	thrombospondin 2
Timp3	Mm00441826_m1	Mm.4871	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
Tlr1	Mm00446095_m1	Mm.273024	toll-like receptor 1
Tlr13	Mm01233819_m1	Mm.336203	toll-like receptor 13
Tlr2	Mm00442346_m1	Mm.87596	toll-like receptor 2
Tlr4	Mm00445273_m1	Mm.38049	toll-like receptor 4
Tlr7	Mm00446590_m1	Mm.23979	toll-like receptor 7
Tlr9	Mm00446193_m1	Mm.44889	toll-like receptor 9
Tmem173	Mm01158117_m1	Mm.45995	transmembrane protein 173
Tnf	Mm00443258_m1	Mm.1293	tumor necrosis factor

Tnfaip3	Mm00437121_m1	Mm.116683	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
Tnfrsf12a	Mm01302476_g1	Mm.28518	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a
Tnfrsf13b	Mm00840182_m1	Mm.265915	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b
Tnfrsf13c	Mm00840578_g1	Mm.240047	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c
Tnfrsf17	Mm00495683_m1	Mm.12935	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
Tnfsf12	Mm02583406_s1	Mm.8983	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
Tnfsf13	Mm03809849_s1	Mm.8983	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
Tnfsf13b	Mm00446347_m1	Mm.28835	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
Tnfsf4	Mm00437214_m1	Mm.4994	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
Tnip1	Mm01288484_m1	Mm.259671	TNFAIP3 interacting protein 1
Tnip2	Mm00460482_m1	Mm.28615	TNFAIP3 interacting protein 2
Tnip3	Mm01181626_m1	Mm.117558	TNFAIP3 interacting protein 3
Traf1	Mm00493827_m1	Mm.239514	TNF receptor-associated factor 1
Traf2	Mm00801978_m1	Mm.3399	TNF receptor-associated factor 2
Trak1	Mm00613053_m1	Mm.491112	trafficking protein, kinesin binding 1
Trem2	Mm04209424_g1	Mm.261623	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
Tst	Mm01195231_m1	Mm.15312	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial
Txnrd2	Mm00496766_m1	Mm.390906	thioredoxin reductase 2
Tyrobp	Mm00449152_m1	Mm.46301	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
Ugt2b34	Mm00655373_m1	Mm.281844	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34
Ugt2b35	Mm00655596_m1	Mm.312095	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B35
Umod	Mm00447649_m1	Mm.10826	uromodulin
Uqcrc1	Mm00445911_m1	Mm.335460	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1
Uqcrc2	Mm00445961_m1	Mm.334206	ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2
Uqcrcs1	Mm00481849_m1	Mm.181933	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
Vamp3	Mm01268442_g1	Mm.273930	vesicle-associated membrane protein 3
Vav1	Mm01232047_m1	Mm.248172	vav 1 oncogene
Vcam1	Mm01320970_m1	Mm.440909	vascular cell adhesion molecule 1
Vegfa	Mm01281449_m1	Mm.282184	vascular endothelial growth factor A
Vegfc	Mm00437310_m1	Mm.1402	vascular endothelial growth factor C
Was	Mm00494167_m1	Mm.4735	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human)
Zbtb46	Mm00511327_m1	Mm.486504	zinc finger and BTB domain containing 46
Zfp36	Mm00457144_m1	Mm.389856	zinc finger protein 36

Taula A2. Llistat de gens induïts pel tractament amb C4BP(β -) ($FC \geq 1.8$)

Símbol gènic	Log ₂ (FC) C4BP(β -)	Assay ID	UniGene ID	Nom del gen (tots en anglès)
Chga	9,2	Mm00514341_m1	Mm.4137	chromogranin A
Pnmt	9,1	Mm00476993_m1	Mm.57030	phenylethanolamine-N-methyltransferase
Adh7	4,1	Mm00507750_m1	Mm.8473	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
Robo1	1,1	Mm00803879_m1	Mm.310772	roundabout homolog 1 (Drosophila)
Serpina1a	1,0	Mm02748447_g1	Mm.439692	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A
Adh1	1,0	Mm00507711_m1	Mm.2409	alcohol dehydrogenase 1 (class I)
Serpina6	1,0	Mm00432327_m1	Mm.290079	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6
Igfbp6	0,9	Mm00599696_m1	Mm.358609	insulin-like growth factor binding protein 6
Ccr6	-0,9	Mm99999114_s1	Mm.8007	chemokine (C-C motif) receptor 6
Cst7	-0,9	Mm00438349_m1	Mm.12965	cystatin F (leukocystatin)
Psm8	-0,9	Mm01278979_m1	Mm.180191	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
Cd22	-0,9	Mm00515432_m1	Mm.260994	CD22 antigen
Havcr1	-0,9	Mm00506686_m1	Mm.17771	hepatitis A virus cellular receptor 1
Blk	-0,9	Mm00432077_m1	Mm.3962	B lymphoid kinase
Cd3d	-0,9	Mm00442746_m1	Mm.4527	CD3 antigen, delta polypeptide
Lat	-1,0	Mm00456761_m1	Mm.10280	linker for activation of T cells
Tnfrsf13c	-1,1	Mm00840578_g1	Mm.240047	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c
Irf7	-1,2	Mm00516793_g1	Mm.3233	interferon regulatory factor 7
Prtn3	-1,3	Mm00478323_m1	Mm.2364	proteinase 3
Ms4a1	-1,4	Mm00545909_m1	Mm.4046	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
S100a8	-1,6	Mm00496696_g1	Mm.21567	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Cd19	-1,6	Mm00515420_m1	Mm.4360	CD19 antigen
Il12a	-2,8	Mm00434165_m1	Mm.103783	interleukin 12a
Saa1	-3,4	Mm00656927_g1	Mm.148800	serum amyloid A 1

Taula A3. Llistat de gens induïts pel tractament amb CYP (FC \geq 1.8)

Símbol gènic	Log ₂ (FC) C4BP(β-)	Assay ID	UniGene ID	Nom del gen (tots en anglès)
Serpina6	2,5	Mm00432327_m1	Mm.290079	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6
Serpina1d	2,1	Mm00842094_mH	Mm.439695	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1D
Npy	1,7	Mm03048253_m1	Mm.154796	neuropeptide Y
Igfbp1	1,6	Mm00515154_m1	Mm.21300	insulin-like growth factor binding protein 1
C8a	1,5	Mm00521627_m1	Mm.197638	complement component 8, alpha polypeptide
Serpina1a	1,5	Mm02748447_g1	Mm.439692	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A
Aldh6a1	1,3	Mm00506227_m1	Mm.247510	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1
Ndrp2	1,2	Mm00443481_g1	Mm.26722	N-myc downstream regulated gene 2
Ace	1,2	Mm00802048_m1	Mm.754	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
Bckdhb	1,1	Mm01177077_m1	Mm.12819	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide
Slc2a4	1,1	Mm01245502_m1	Mm.10661	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
Aldh4a1	1,1	Mm00615268_m1	Mm.273571	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1
Plcd4	1,1	Mm00455768_m1	Mm.290731	phospholipase C, delta 4
Por	1,1	Mm00435876_m1	Mm.3863	P450 (cytochrome) oxidoreductase
Fmo1	1,1	Mm00515795_m1	Mm.976	flavin containing monooxygenase 1
Pik3c2g	1,1	Mm00440781_m1	Mm.333471	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide
Klkb1	1,0	Mm00434658_m1	Mm.482691	kallikrein B, plasma 1
Cbs	1,0	Mm00460654_m1	Mm.206417	cystathionine beta-synthase
Sod2	1,0	Mm01313000_m1	Mm.290876	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Ugt2b34	1,0	Mm00655373_m1	Mm.281844	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34
Fmo4	1,0	Mm00467393_m1	Mm.155164	flavin containing monooxygenase 4
Nox4	1,0	Mm00479246_m1	Mm.31748	NADPH oxidase 4
Ahcyl2	1,0	Mm00619649_m1	Mm.210899	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2
Scd1	1,0	Mm00772290_m1	Mm.267377	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
Prkcz	1,0	Mm00776345_g1	Mm.28561	protein kinase C, zeta
Cat	1,0	Mm00437992_m1	Mm.4215	catalase
Adhfe1	1,0	Mm00613830_m1	Mm.28514	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1
Serpina1d; Serpina1b	1,0	Mm04207706_gH	Mm.439692	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1B
Idh3b	0,9	Mm00504589_m1	Mm.29590	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
Sardh	0,9	Mm00454657_m1	Mm.278467	sarcosine dehydrogenase
Sord	0,9	Mm00455377_g1	Mm.371580	sorbitol dehydrogenase
Id1	0,9	Mm00775963_g1	Mm.444	inhibitor of DNA binding 1
Aldh9a1	0,9	Mm00480240_m1	Mm.292539	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1
Sdha	0,9	Mm01352366_m1	Mm.158231	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
Bckdha	0,9	Mm00476112_m1	Mm.25848	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide

Suox	0,9	Mm00620388_g1	Mm.23352	sulfite oxidase
Tst	0,9	Mm01195231_m1	Mm.15312	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial
Pcca	0,9	Mm00454899_m1	Mm.23876	propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide
ldh3g	0,9	Mm00599686_g1	Mm.14825	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma
Hnf4a	0,9	Mm01247712_m1	Mm.202383	hepatic nuclear factor 4, alpha
Ndufa10	0,9	Mm00600325_m1	Mm.248778	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10
Ppm1l	0,9	Mm00618786_m1	Mm.40577	protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like
Prdx3	0,9	Mm00545848_m1	Mm.29821	peroxiredoxin 3
Got1	0,9	Mm01195792_g1	Mm.19039	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble
Ndufaf1	0,9	Mm00452828_m1	Mm.5390	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 1
Gss	0,9	Mm00515065_m1	Mm.252316	glutathione synthetase
Auh	0,9	Mm00479363_m1	Mm.252034	AU RNA binding protein/enoyl-coenzyme A hydratase
Ndufs7	0,9	Mm01144210_m1	Mm.28712	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
Atp5f1	0,9	Mm01296543_g1	Mm.251152	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit B1
Timp3	0,8	Mm00441826_m1	Mm.4871	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
Aldh2	0,8	Mm00477463_m1	Mm.284446	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
Stat3	-0,9	Mm01219775_m1	Mm.249934	signal transducer and activator of transcription 3
Irf1	-0,9	Mm01288580_m1	Mm.105218	interferon regulatory factor 1
B2m	-0,9	Mm00437762_m1	Mm.163	beta-2 microglobulin
Cx3cl1	-0,9	Mm00436454_m1	Mm.103711	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Ctgf	-0,9	Mm01192932_g1	Mm.390287	connective tissue growth factor
Hmox1	-0,9	Mm00516005_m1	Mm.276389	heme oxygenase 1
F3	-0,9	Mm00438853_m1	Mm.273188	coagulation factor III
Tnfaip3	-0,9	Mm00437121_m1	Mm.116683	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
Icam1	-0,9	Mm00516023_m1	Mm.435508	intercellular adhesion molecule 1
Tgfb1	-1,0	Mm01178820_m1	Mm.248380	transforming growth factor, beta 1
Sh3bp2	-1,0	Mm00449397_m1	Mm.5012	SH3-domain binding protein 2
Lyn	-1,0	Mm01217488_m1	Mm.317331	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog
Traf1	-1,0	Mm00493827_m1	Mm.239514	TNF receptor-associated factor 1
ApoE	-1,0	Mm01307193_g1	Mm.305152	apolipoprotein E
Tnfsf4	-1,0	Mm00437214_m1	Mm.4994	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
Cebpb	-1,0	Mm00843434_s1	Mm.439656	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
Irf9	-1,0	Mm00492679_m1	Mm.2032	interferon regulatory factor 9
Inpp5d	-1,0	Mm00494987_m1	Mm.15105	inositol polyphosphate-5-phosphatase D
Igfbp6	-1,0	Mm00599696_m1	Mm.358609	insulin-like growth factor binding protein 6
Cfh	-1,0	Mm01299248_m1	Mm.8655	complement component factor h
Arpc1b	-1,0	Mm00834862_m1	Mm.30010	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B
C1qc	-1,0	Mm00776126_m1	Mm.439732	complement component 1, q subcomponent, C chain
C4bp	-1,0	Mm00432150_m1	Mm.306720	complement component 4 binding protein
Cxcr4	-1,0	Mm01996749_s1	Mm.1401	chemokine (C-X-C motif) receptor 4

C1ra	-1,1	Mm04206253_g1	Mm.333375	complement component 1, r subcomponent A
Fga	-1,1	Mm00802584_m1	Mm.88793	fibrinogen alpha chain
Csf1	-1,1	Mm00432686_m1	Mm.795	colony stimulating factor 1 (macrophage)
C1s1	-1,1	Mm00663210_mH	Mm.219527	complement component 1, s subcomponent 1
Ikke	-1,1	Mm00444862_m1	Mm.386783	inhibitor of kappaB kinase epsilon
Map3k8	-1,2	Mm00432637_m1	Mm.3275	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
Pycard	-1,2	Mm00445747_g1	Mm.24163	PYD and CARD domain containing
Tlr4	-1,2	Mm00445273_m1	Mm.38049	toll-like receptor 4
Ccr1	-1,2	Mm00438260_s1	Mm.274927	chemokine (C-C motif) receptor 1
Cxcl9	-1,2	Mm00434946_m1	Mm.766	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Thbs2	-1,2	Mm01279240_m1	Mm.26688	thrombospondin 2
Psmc9	-1,2	Mm00479004_m1	Mm.390983	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)
Il2rg	-1,3	Mm00442885_m1	Mm.2923	interleukin 2 receptor, gamma chain
Ncf1	-1,3	Mm00447921_m1	Mm.425296	neutrophil cytosolic factor 1
Relb	-1,3	Mm00485664_m1	Mm.1741	avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B
Cxcl10	-1,3	Mm00445235_m1	Mm.877	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Mpo	-1,3	Mm01298424_m1	Mm.4668	myeloperoxidase
Fgg	-1,3	Mm00513575_m1	Mm.16422	fibrinogen gamma chain
Cd1d1	-1,4	Mm00783541_s1	Mm.1894	CD1d1 antigen
Ifng	-1,4	Mm01168134_m1	Mm.240327	interferon gamma
Fgb	-1,4	Mm00805336_m1	Mm.30063	fibrinogen beta chain
S100a8	-1,4	Mm00496696_g1	Mm.21567	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Serping1	-1,4	Mm00437834_m1	Mm.38888	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1
Nfkbie	-1,4	Mm01269649_m1	Mm.57043	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, epsilon
Tlr7	-1,4	Mm00446590_m1	Mm.23979	toll-like receptor 7
Ptpn22	-1,4	Mm00501246_m1	Mm.395	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)
Tlr1	-1,4	Mm00446095_m1	Mm.273024	toll-like receptor 1
Il33	-1,4	Mm00505403_m1	Mm.182359	interleukin 33
Nlrp3	-1,4	Mm00840904_m1	Mm.54174	NLR family, pyrin domain containing 3
Tnf	-1,4	Mm00443258_m1	Mm.1293	tumor necrosis factor
Mmp9	-1,5	Mm00442991_m1	Mm.4406	matrix metalloproteinase 9
Tap1	-1,5	Mm00443188_m1	Mm.482076	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
Tnip3	-1,5	Mm01181626_m1	Mm.117558	TNFAIP3 interacting protein 3
Casp1	-1,5	Mm00438023_m1	Mm.1051	caspase 1
Prkcb	-1,5	Mm00435749_m1	Mm.207496	protein kinase C, beta
Il12b	-1,5	Mm00434174_m1	Mm.239707	interleukin 12b
Il27	-1,5	Mm00461162_m1	Mm.222632	interleukin 27
Ccl5	-1,5	Mm01302427_m1	Mm.284248	chemokine (C-C motif) ligand 5
Spi1	-1,5	Mm00488142_m1	Mm.1302	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene
Chga	-1,5	Mm00514341_m1	Mm.4137	chromogranin A
Csf2rb	-1,5	Mm00655745_m1	Mm.235324	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)

Tyrobp	-1,5	Mm00449152_m1	Mm.46301	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
Itga4	-1,5	Mm01277951_m1	Mm.31903	integrin alpha 4
Il27ra	-1,6	Mm00497259_m1	Mm.38386	interleukin 27 receptor, alpha
Cst7	-1,6	Mm00438349_m1	Mm.12965	cystatin F (leukocystatin)
Spn	-1,6	Mm01164549_m1	Mm.283714	sialophorin
Ikzf1	-1,6	Mm01187882_m1	Mm.103545	IKAROS family zinc finger 1
Pik3cg	-1,6	Mm00445038_m1	Mm.101369	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
Lck	-1,6	Mm00802897_m1	Mm.293753	lymphocyte protein tyrosine kinase
Stat4	-1,6	Mm00448890_m1	Mm.1550	signal transducer and activator of transcription 4
Tlr9	-1,6	Mm00446193_m1	Mm.44889	toll-like receptor 9
Tnfsf13b	-1,6	Mm00446347_m1	Mm.28835	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
Psmb8	-1,6	Mm01278979_m1	Mm.180191	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
Trem2	-1,6	Mm04209424_g1	Mm.261623	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
Cx3cr1	-1,6	Mm02620111_s1	Mm.44065	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
Was	-1,6	Mm00494167_m1	Mm.4735	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human)
Il27ra	-1,6	Mm00497259_m1	Mm.38386	interleukin 27 receptor, alpha
Rac2	-1,6	Mm00485472_m1	Mm.1972	RAS-related C3 botulinum substrate 2
Cd83	-1,6	Mm00486868_m1	Mm.57175	CD83 antigen
Vav1	-1,6	Mm01232047_m1	Mm.248172	vav 1 oncogene
Btk	-1,7	Mm00442712_m1	Mm.4475	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
Blk	-1,7	Mm00432077_m1	Mm.3962	B lymphoid kinase
Ccr7	-1,7	Mm01301785_m1	Mm.2932	chemokine (C-C motif) receptor 7
Pdcd1lg2	-1,7	Mm00451734_m1	Mm.116737	programmed cell death 1 ligand 2
Cd22	-1,7	Mm00515432_m1	Mm.260994	CD22 antigen
Tmem173	-1,7	Mm01158117_m1	Mm.45995	transmembrane protein 173
Cd86	-1,7	Mm00444543_m1	Mm.1452	CD86 antigen
Itgb2	-1,7	Mm00434513_m1	Mm.1137	integrin beta 2
Hck	-1,7	Mm01241463_m1	Mm.715	hemopoietic cell kinase
Tnfrsf12a	-1,7	Mm01302476_g1	Mm.28518	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a
Clec7a	-1,7	Mm01183349_m1	Mm.239516	C-type lectin domain family 7, member a
Cd79b	-1,7	Mm00434143_m1	Mm.2987	CD79B antigen
Icos	-1,7	Mm00497600_m1	Mm.42044	inducible T cell co-stimulator
Tlr13	-1,8	Mm01233819_m1	Mm.336203	toll-like receptor 13
Fasl	-1,8	Mm00438864_m1	Mm.3355	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Fcer1g	-1,8	Mm02343757_m1	Mm.22673	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide
Aim2	-1,8	Mm01295719_m1	Mm.131453	absent in melanoma 2
Pld4	-1,8	Mm00626861_m1	Mm.203915	phospholipase D family, member 4
C1qa	-1,8	Mm00432142_m1	Mm.439957	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide
Cd276	-1,8	Mm00506020_m1	Mm.5356	CD276 antigen
Tnfrsf13b	-1,8	Mm00840182_m1	Mm.265915	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b
Osmr	-1,8	Mm01307326_m1	Mm.10760	oncostatin M receptor

Cd74	-1,8	Mm00658576_m1	Mm.439737	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
Prtn3	-1,8	Mm00478323_m1	Mm.2364	proteinase 3
Syk	-1,8	Mm01333032_m1	Mm.375031	spleen tyrosine kinase
Cd48	-1,9	Mm00455932_m1	Mm.1738	CD48 antigen
Il10ra	-1,9	Mm00434151_m1	Mm.379327	interleukin 10 receptor, alpha
Cxcl1	-1,9	Mm04207460_m1	Mm.21013	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Irf7	-1,9	Mm00516793_g1	Mm.3233	interferon regulatory factor 7
Clec10a	-1,9	Mm00546125_g1	Mm.252405	C-type lectin domain family 10, member A
C3ar1	-1,9	Mm02620006_s1	Mm.2408	complement component 3a receptor 1
C1qb	-1,9	Mm01179619_m1	Mm.2570	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
Fcgr3	-1,9	Mm00438882_m1	Mm.22119	Fc receptor, IgG, low affinity III
Cd3g	-1,9	Mm00438095_m1	Mm.335106	CD3 antigen, gamma polypeptide
Clu	-1,9	Mm01197002_m1	Mm.200608	clusterin
Ltb	-2,0	Mm00434774_g1	Mm.1715	lymphotoxin B
Lcp2	-2,0	Mm01187570_m1	Mm.265350	lymphocyte cytosolic protein 2
Irf202b	-2,0	Mm00839397_m1	Mm.218770	interferon activated gene 202B
Lat	-2,0	Mm00456761_m1	Mm.10280	linker for activation of T cells
Vcam1	-2,0	Mm01320970_m1	Mm.440909	vascular cell adhesion molecule 1
Il1r2	-2,0	Mm00439629_m1	Mm.1349	interleukin 1 receptor, type II
Pik3r5	-2,0	Mm00805206_m1	Mm.244960	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101
Ptprc	-2,0	Mm01293577_m1	Mm.391573	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Spp1	-2,0	Mm00436767_m1	Mm.288474	secreted phosphoprotein 1
Ccr2	-2,0	Mm00438270_m1	Mm.6272	chemokine (C-C motif) receptor 2
Col1a2	-2,1	Mm00483888_m1	Mm.277792	collagen, type I, alpha 2
Fn1	-2,1	Mm01256744_m1	Mm.193099	fibronectin 1
Cd80	-2,1	Mm00711660_m1	Mm.89474	CD80 antigen
Foxp3	-2,1	Mm00475162_m1	Mm.182291	forkhead box P3
Cd40lg	-2,1	Mm00441911_m1	Mm.4861	CD40 ligand
Clec4n	-2,2	Mm00490934_m1	Mm.271782	C-type lectin domain family 4, member n
Pnmt	-2,2	Mm00476993_m1	Mm.57030	phenylethanolamine-N-methyltransferase
Ctla4	-2,2	Mm00486849_m1	Mm.390	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Msr1	-2,2	Mm00446214_m1	Mm.239291	macrophage scavenger receptor 1
Il1b	-2,2	Mm00434228_m1	Mm.222830	interleukin 1 beta
Cd28	-2,2	Mm00483137_m1	Mm.255003	CD28 antigen
Ccr6	-2,2	Mm99999114_s1	Mm.8007	chemokine (C-C motif) receptor 6
Cd3d	-2,3	Mm00442746_m1	Mm.4527	CD3 antigen, delta polypeptide
Il10	-2,3	Mm00439614_m1	Mm.874	interleukin 10
Gpnmb	-2,3	Mm01328587_m1	Mm.302602	glycoprotein (transmembrane) nmb
Serpine1	-2,3	Mm00435860_m1	Mm.250422	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Ctss	-2,3	Mm01255859_m1	Mm.3619	cathepsin S
Ccl9	-2,3	Mm00441260_m1	Mm.416125	chemokine (C-C motif) ligand 9
Cd19	-2,3	Mm00515420_m1	Mm.4360	CD19 antigen
Cd300lb	-2,3	Mm01701741_m1	Mm.185355	CD300 antigen like family member B

Fcgr4	-2,3	Mm00519988_m1	Mm.251254	Fc receptor, IgG, low affinity IV
Cd5	-2,4	Mm00432417_m1	Mm.779	CD5 antigen
Tnfrsf17	-2,4	Mm00495683_m1	Mm.12935	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
Tnfrsf13c	-2,4	Mm00840578_g1	Mm.240047	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c
Irf4	-2,4	Mm00516431_m1	Mm.4677	interferon regulatory factor 4
Fcgr1	-2,4	Mm00438874_m1	Mm.150	Fc receptor, IgG, high affinity I
Ccl2	-2,4	Mm00441242_m1	Mm.290320	chemokine (C-C motif) ligand 2
Ms4a1	-2,5	Mm00545909_m1	Mm.4046	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
Havcr1	-2,5	Mm00506686_m1	Mm.17771	hepatitis A virus cellular receptor 1
Cd14	-2,5	Mm00438094_g1	Mm.3460	CD14 antigen
Itgam	-2,5	Mm00434455_m1	Mm.262106	integrin alpha M
Il7r	-2,6	Mm00434295_m1	Mm.389	interleukin 7 receptor
C3	-2,7	Mm00437838_m1	Mm.19131	complement component 3
Cxcl2	-2,7	Mm00436450_m1	Mm.4979	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
Ereg	-2,7	Mm00514794_m1	Mm.4791	epiregulin
Il17a	-2,7	Mm00439618_m1	Mm.5419	interleukin 17A
Col3a1	-2,7	Mm01254476_m1	Mm.249555	collagen, type III, alpha 1
Ccr5	-2,7	Mm01963251_s1	Mm.14302	chemokine (C-C motif) receptor 5
Socs3	-2,8	Mm00545913_s1	Mm.3468	suppressor of cytokine signaling 3
C6	-2,8	Mm00489521_m1	Mm.20247	complement component 6
Col1a1	-3,0	Mm00801666_g1	Mm.277735	collagen, type I, alpha 1
Cxcl13	-3,1	Mm04214185_s1	Mm.10116	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Saa1	-4,5	Mm00656927_g1	Mm.148800	serum amyloid A 1
Il1f6	-6,0	Mm00457645_m1	Mm.133095	interleukin 1 family, member 6



Exploring the Immunomodulatory Moonlighting Activities of Acute Phase Proteins for Tolerogenic Dendritic Cell Generation

Inmaculada Serrano[†], Ana Luque[†] and Josep M. Aran^{*}

Immune-Inflammatory Processes and Gene Therapeutics Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Catharien Hilkens,
Newcastle University,
United Kingdom

Reviewed by:

Philippe Blancou,
University of Nice Sophia
Antipolis, France
Muriel Moser,
Free University of Brussels,
Belgium

*Correspondence:

Josep M. Aran
jaran@idibell.cat

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted
to Immunological Tolerance
and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 December 2017

Accepted: 10 April 2018

Published: 30 April 2018

Citation:

Serrano I, Luque A and Aran JM
(2018) Exploring the
Immunomodulatory Moonlighting
Activities of Acute Phase Proteins for
Tolerogenic Dendritic Cell Generation.
Front. Immunol. 9:892.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00892

The acute phase response is generated by an overwhelming immune-inflammatory process against infection or tissue damage, and represents the initial response of the organism in an attempt to return to homeostasis. It is mediated by acute phase proteins (APPs), an assortment of highly conserved plasma reactants of seemingly different functions that, however, share a common protective role from injury. Recent studies have suggested a crosstalk between several APPs and the mononuclear phagocyte system (MPS) in the resolution of inflammation, to restore tissue integrity and function. In fact, monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs), an integral component of the MPS, play a fundamental role both in the regulation of antigen-specific adaptive responses and in the development of immunologic memory and tolerance, particularly in inflammatory settings. Due to their high plasticity, Mo-DCs can be modeled *in vitro* toward a tolerogenic phenotype for the treatment of aberrant immune-inflammatory conditions such as autoimmune diseases and allotransplantation, with the phenotypic outcome of these cells depending on the immunomodulatory agent employed. Yet, recent immunotherapy trials have emphasized the drawbacks and challenges facing tolerogenic Mo-DC generation for clinical use, such as reduced therapeutic efficacy and limited *in vivo* stability of the tolerogenic activity. In this review, we will underline the potential relevance and advantages of APPs for tolerogenic DC production with respect to currently employed immunomodulatory/immunosuppressant compounds. A further understanding of the mechanisms of action underlying the moonlighting immunomodulatory activities exhibited by several APPs over DCs could lead to more efficacious, safe, and stable protocols for precision tolerogenic immunotherapy.

Keywords: acute phase proteins, inflammation, monocyte-derived dendritic cells, tolerance, immunotherapy

INTRODUCTION

In the superior organisms, inflammation is considered as an evolutionarily conserved, physiological response of the vascularized tissue against external physical, chemical, and biological insults, or internal threats such as metabolic stress. This complex, exquisitely fine-tuned and coordinated process is engaged with the final goal of restoring the homeostasis and repair/regenerate the damaged tissues in a relatively short-time window (1). Whether the insult persists, chronic undesirable inflammation ensues and is associated with a variety of pathologies such as autoimmune processes or vascular diseases. Innate immune cells with the capacity for antigen presentation, that is,

specialized antigen-presenting cells (APCs) such as monocytes/macrophages and dendritic cells (DCs), are key players in all phases of inflammation (2). Thus, APCs are involved in the initial sensing of noxious agents through recognition of danger-associated molecular patterns (DAMPs), including pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), in the amplification of the defense/protection by locally attracting other immune cells through the vasculature and, finally, are essential effector cells in the resolution of inflammation. All these events are orchestrated mainly by DCs, endowed with high plasticity to bridge innate and acquired immune responses within the inflammatory program (3, 4). Local DAMPs/PAMPs detection by pattern recognition molecules (PRMs), notably the toll-like receptor (TLR) family of proteins, in these cells initiates an adaptive immune process leading to the activation and expansion of antigen-specific effector T lymphocytes in the secondary lymphoid organs (5). Conversely, the absence of pro-inflammatory stimuli or engagement of particular immunoreceptors, such as co-inhibitory receptors (PD-L1, PD-L2, B7-H3, ILT3, etc.) or other tyrosine-based inhibitory motif-containing receptors by a variety of signals maintain DCs in an “immature-like” state. These, “immature” DCs are able to elicit generalized or antigen-specific unresponsiveness/tolerance in central lymphoid organs or in the periphery, promoting the further stimulation of T cells (Treg) able to regulate or suppress other T cells (6). Such actions are crucial to maintain or return to immune homeostasis and to prevent autoimmune responses.

Another inherent aspect of the innate immunity elicited in wounded hosts (particularly those severely injured by trauma or microbial infection), in parallel to the advent of the above-described cellular or acquired immune response, is the prompt occurrence of a prominent non-specific immune-inflammatory response involving systemic physiological and metabolic alterations and affecting tissues/organs distant to the injured site, namely, the acute phase response (7). Thus, immunological stress induces a pro-inflammatory cytokine “storm,” diffusing into the circulation and alerting the liver, which in turn reinforces a protective response through coordinated, cytokine-driven transcriptional changes in hepatocytes, leading to the secretion of a variety of molecules that limit tissue injury and participate in host defense, termed acute phase proteins (APPs), such as the prototypical C-reactive protein (CRP), serum amyloid P (SAP), and serum amyloid A (SAA). These proteins have been traditionally explored as diagnostic/prognostic biomarkers reflecting the presence and intensity of inflammation during infection or injury. Indeed, while most APPs have been traditionally viewed as having a pro-inflammatory function, for example, in immune cell recruitment for efficient pathogen clearance (8), more recent studies are suggesting that a variety of APPs, depending on the microenvironment and through molecular mechanisms not yet completely understood, are able to interact directly with mononuclear phagocytes inducing a regulatory phenotype to these cells.

Mirroring the recent success and increasing importance of cellular immunotherapy strategies for cancer, in the last years a substantial effort has been devoted to generate DCs from blood precursors with tolerogenic features for the treatment of autoimmune diseases, allergy, and transplantation. As the first phase I adoptive tolerogenic DC therapy clinical trials are being concluded,

preliminary lessons learned include the overall safety of tolerogenic DC administration, although also highlight present limitations regarding its efficacy. Thus, important current challenges to overcome for a more effective therapeutic outcome include the achievement of antigen-specific tolerogenic responses and, particularly, the maintenance of a “stable” tolerogenic phenotype of the infused DCs regardless of the inflammatory microenvironment that they may confront. Therefore, more progress has to be achieved on the thorough characterization, using both *in vitro* functional readouts and preclinical assays, of tolerogenic DCs generated through alternative immunomodulatory inducers able to increase their clinical performance in immune-inflammatory pathologies.

In this review, we will consider the potential of APPs as novel immunomodulators. We will overview the current knowledge regarding the interaction of relevant APPs with phagocytes, fundamentally monocytes, and monocyte-derived DCs (Mo-DCs), resulting in a bias toward immune tolerance. A better understanding of the crosstalk between the innate and the adaptive immune systems in homeostasis and inflammatory pathology, taking into account the unique roles of both APPs and DCs, may support therapeutic benefits of APP-induced tolerogenic DCs for transplantation and autoimmunity.

THE ACUTE PHASE RESPONSE AT THE CROSSROADS BETWEEN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY

The immediate innate body defense against acute illnesses, that is, the acute phase response, features both, hepatic and extra-hepatic overproduction and release, typically within 24–48 h after the initial insult, of a variety of seemingly biochemically and functionally unrelated APPs into the circulation. In fact, phagocyte sentinels (macrophages, DCs, and neutrophils) sensing eminently damaged, stressed or infected cells, elicit a local pro-inflammatory response, and seek further help by secreting pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1, IL-8, TNF- α , and IFN- γ , and releasing a large assortment of “alarmins.” These key mediators travel through the circulation, induce neuroendocrine and behavioral changes (fever, hyponatremia, anorexia, somnolence, and lethargy), and reach the liver, whose most abundant cell type, the hepatocytes, hold also the capability to act as immunological agents and have a central role in the systemic innate immune response through the intravascular secretion of APPs (9). Indeed, APPs conform up to 40 different proteins whose serum concentration increase (positive APPs) or decrease (negative APPs) at least 25% in response to inflammation (10). Positive APPs include soluble PRMs [CRP, SAP, SAA, lipopolysaccharide binding protein, complement components, and α 1 acid glycoprotein (AAG)], hemostasis factors (fibrinogen, plasminogen, prothrombin, and plasminogen activators), binding/transport proteins [haptoglobin (Hp), hemoexin, and ceruloplasmin], and antiproteases [α 1-antichymotrypsin (AAC), antithrombin (AT), α 1-antitrypsin (AAT), and α 2-macroglobulin (α ₂M)]. These proteins participate in host defense (e.g., attracting inflammatory cells, inactivating proteolytic enzymes, activating complement, opsonizing, and clearing infectious agents) and

limit tissue injury (scavenging free radicals and modulating the host's immune response). Conversely, negative APPs comprise albumin, AT, transferrin, transthyretin, transthyretin, and retinol-binding protein (8). It has been suggested that reduced albumin production enhances the amino acids "pool" available for positive APP production, and that decreased transferrin production could protect the host by starving microorganisms of the iron required for growth and virulence expression (11).

Based on their degree of response to inflammatory stimuli, APPs can be grouped as strong (more than 100-fold increase in blood levels; CRP, α_2 M, SAA), moderate (2–10-fold increase; haptoglobin, fibrinogen, AAT), or weak (up to twofold increase; C3, ceruloplasmin). While strong APPs usually increase abruptly within the first 24–48 h after an acute inflammatory event, and further experience a quick decline related to their relatively short half-life, moderate to weak APPs are more likely present during chronic inflammatory processes. According to the differential regulation of their synthesis by cytokines, positive APPs can also be classified in type I and type II. Type I are induced by IL-1-like pro-inflammatory cytokines (SAA, CRP, C3, AAG, and SAP), and type II are induced by IL-6-like cytokines (fibrinogen, Hp, AAC, AAT, and α_2 M). In turn, the production of hepatic APPs may also be influenced by other cytokines and by hormones (insulin, dexamethasone, glucagon, and/or epinephrine) (12). Thus, at the level of the organism, the complex neuroendocrine-immunological axis seems to efficiently modulate the acute phase response through various feedback loops (13). For instance, cytokines released from monocytes/macrophages activated locally through noxious inflammatory agents stimulate the brain to release stress-response neuropeptides such as corticotropin (ACTH), which acts into the adrenal glands inducing glucocorticoid production. Glucocorticoids can downregulate pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF- α).

Due to their stability in the circulation compared with cytokines, which are cleared from the circulation within a few hours, several APPs have been extensively used as diagnostic/prognostic biomarkers because their increased/decreased levels reflect the presence and intensity of inflammation during infection or injury, remaining unchanged for 48 h or longer. Nevertheless, although presenting high sensitivity, the diagnostic value of APPs is being questioned due to their low specificity (14).

INFLAMMATORY DCs IN INFLAMMATION

Relevant features of the acute phase response are an increase in the number of peripheral leukocytes and the dilation and leakage of the vasculature through the release of inflammatory mediators such as reactive oxygen species, arachidonate metabolites, and pro-inflammatory cytokines and chemokines (15). Pro-inflammatory cytokines activate and mobilize blood cell precursors in both bone marrow and peripheral blood (16–18). Moreover, stimulated endothelial cells allow the extravasation and migration of circulating leukocytes. Among these, Mo-DCs have been appealing due to: (1) their influence on adaptive immune function and rapid accumulation in the inflammatory focus and (2) their easy *ex vivo* isolation, amplification, and manipulation. Mo-DCs arise from monocyte precursors both

in vitro and *in vivo* (19, 20). Monocytes are recruited to sites of inflammation, having a major role in the protective immune response of the host (21). For instance, local differentiation of monocytes into inflammatory macrophages and DCs is induced in response to natural killer cell-produced IFN- γ (22). In fact, by depletion of tissue-resident cell populations it has been shown that circulating monocyte precursors in the blood can replenish functionally specialized macrophages and DCs (23), which reinforces the concept of blood monocytes as reservoirs that can be utilized on demand, particularly in inflammatory processes where monocyte recruitment is strongly increased. Accordingly, monocytes have been shown to migrate to inflammatory sites and differentiate into DCs in various murine models of inflammation (24, 25). Sequential trafficking and/or differentiation of the different monocyte subsets to the sites of inflammation is likely modulated by diverse mechanisms (26–28). Following tissue damage, classical monocytes (human: CD14⁺⁺CD16⁻; mouse: Ly6C⁺CCR2^{high}CX₃CR1^{low}) appear to be recruited within the first few hours, after their egression from the bone marrow being modulated by the CCR2–CCL2/CCL7 axis (29). Once in the inflammatory milieu, they differentiate into DCs and macrophages and exert a potent pro-inflammatory immune response through high-level production of IL-1 β and TNF- α , among other protective functions (30–32). When the progression of the immune-inflammatory response is not halted, the prolonged action of classical inflammatory monocytes may result in tissue damage and drive autoimmunity (33). Several days after the initial damaging insult, acute inflammation enters in a resolution phase where the classical monocyte levels are reduced and progressively replaced by intermediate [CD14⁺⁽⁺⁾CD16⁺] and non-classical (human: CD14⁺CD16⁺⁺; mouse: Ly6C⁻CCR2^{low}CX₃CR1^{high}) monocytes, which relay on the CX₃CR1–CX₃CL1 axis to accumulate in the damaged tissue and, after DC/macrophage differentiation, secrete anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β) that counteract tissue injury and promote wound healing (34). Certainly, it has been suggested that, in response to inflammatory stimuli, patrolling non-classical CD16-expressing monocytes could leave the blood vessels and function as DC precursors (35). Thus, these inflammatory Mo-DCs seem to hold unique features influenced by the microenvironmental status of the inflamed tissue, boosting more potent immune responses DCs derived from classical monocytes, and better immune tolerance DCs generated from non-classical monocytes (36).

Monocytes from human or mouse peripheral blood or bone marrow are widely utilized to generate *in vitro* large amounts of Mo-DCs upon differentiation, typically with IL-4 and GM-CSF (37), allowing comprehensive mechanistic studies regarding their key role in the immune-inflammatory processes at the molecular level and to initiate DC therapy approaches in the clinic. In fact, a comparative transcriptional profiling has revealed that human DCs isolated from inflammatory fluids are the *in vivo* counterpart of *in vitro*-generated Mo-DCs from CD14⁺ monocytes (38), in the same way that murine inflammatory DCs share equivalent developmental and functional features to *in vitro* GM-CSF/IL-4-induced BM-DCs (39).

Monocyte-derived cells have been deemed essential for inducing protective Th1 cell-mediated immunity following both pathogen

infection and non-infectious conditions (40, 41), and may acquire DC-specific functions such as cross-presentation (41, 42).

Conversely, DCs play a key role in tolerance, whether participating in the negative selection of autoreactive T cells in the thymus (central tolerance) (43), or limiting effector T cells through deletion or anergy and, instead, promoting Treg differentiation (peripheral tolerance). A variety of mechanisms are orchestrated by DCs to induce tolerance and suppress inflammatory responses against innocuous stimuli, including the overexpression of inhibitory immunoreceptors (e.g., PD-L1, B7H, and CD80/86), the ligand-activated transcription factor aryl hydrocarbon receptor, the pore-forming cytolytic protein perforin, and the release and/or control of several immunomodulatory mediators, such as anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-27, and TGF- β), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) metabolites, retinoic acid, vitamins A and D, ATP, and adenosine [see Ref. (44, 45), and references therein]. The regulatory function of DCs is determined by their maturation/activation status (46). Hence, tolerogenic DCs hold an “immature” or “semi-mature” state.

A myriad of recent studies has reported the *in vitro* generation of monocyte-derived “permissive,” “tolerogenic,” “regulatory,” “alternatively activated,” or “maturation-resistant” cell types (47), although most attention has been focused on Mo-DCs. This is being achieved by incubation with a variety of different biological or pharmacological agents such as cytokines (IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-21, and thymic stromal lymphopoietin), immunosuppressant drugs (dexamethasone, tacrolimus, and mycophenolate), organic molecules (vitamin D₃, salicylate, vasoactive intestinal peptide, intravenous immunoglobulin, and hepatocyte growth factor), other agents (pathogen products, mesenchymal stem cells), or their combinations, or by genetic engineering (48–50). Mimicking the *in vivo* circumstances, the resulting tolerogenic Mo-DCs are characterized essentially by reduced surface expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86, and CD40) and maturation markers (CD83), increased expression of inhibitory receptors (ILT3, PD-L1, and PD-L2), reduced or null production of pro-inflammatory cytokines (IL-12, TNF- α , IFN- γ , and IL-8) and, conversely, increased production of anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β), even in the presence of inflammation (51–54). Thus, the main features of these cells would be to present a state of unresponsiveness through hampering key activation/maturation pathways such as the pro-inflammatory NF- κ B pathway, and to support the differentiation and maintenance of different types of Treg cells.

TOLEROGENIC ACTIONS OF APPs ON DCs

There are clear evidences showing that the acute phase response can directly influence the differentiation of DCs toward a tolerogenic state. In sepsis, an overwhelming systemic inflammatory response syndrome, an expansion of intermediate monocytes has been detected in the circulation (55). Monocytes from sepsis patients preferentially differentiated into alternative CD1a⁻ DCs, holding increased capacity to induce Foxp3⁺ Treg cells, when compared with monocytes from healthy individuals in which classical monocytes predominated (56). On the other hand, the

hepatic APPs SAA and Cxcl1/KC cooperatively promoted myeloid-derived suppressor cell (MDSC) mobilization, accumulation and survival, reversed dysregulated inflammation, and restored survival of mice deficient for gp130 (the signaling receptor shared by IL-6 family cytokines) undergoing polymicrobial sepsis (57). Thus, hepatocytes may also modulate innate immune cells through the acute phase response, for example, by recruitment and promotion of MDSC function.

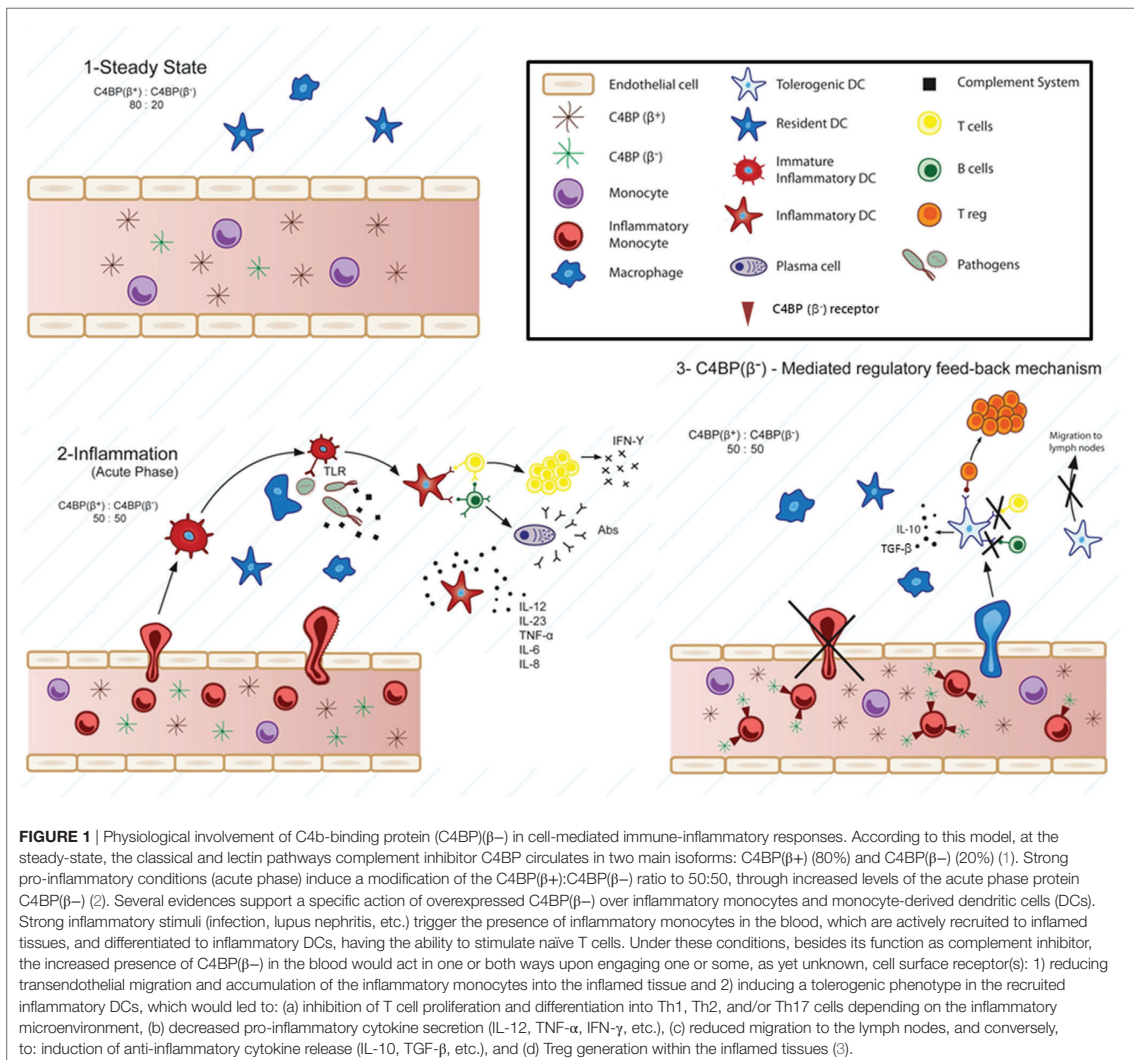
Accordingly, it is not unreasonable to consider a number of APPs, acting either systemically or locally in a restricted time window coinciding with a parallel increase of monocyte recruitment toward the inflammatory focus, as a part of a protective network to restrain the harmful consequences of continued overinflammation. That is, APPs could directly exert a feedback loop redirecting the differentiation of these inflammatory monocytes to regulatory or tolerogenic DCs, in an attempt to regain homeostasis and maintain tissue integrity through the resolution of the immune-inflammatory response (Figure 1). We will now focus in representative APPs and APP-related proteins that are able to induce tolerogenesis through modulation of Mo-DC differentiation and/or maturation.

Soluble PRMs are a heterogeneous group of molecules (collectins, ficolins, pentraxins, and other complement components) belonging to the humoral arm of innate immunity that have been proposed to represent the functional ancestor of antibodies (58). They share basic functions with the membrane-bound PRMs from DCs, such as the recognition of “non-self” and “modified self” and, additionally, play an important role in opsonization and complement activation. In the last years, several studies have evidenced that APPs, particularly soluble PRMs, acting directly in the early stages of monocyte differentiation mediated by GM-CSF/IL-4 (a faithful *in vitro* model for the generation of inflammatory DCs), are able to confer a tolerogenic phenotype and function to the ensuing Mo-DCs, although the detailed molecular mechanisms of APPs action over DCs are still not known for most of them.

In the next paragraphs, we will address the state of understanding and arguments regarding APP-mediated tolerogenic DC generation and functional outcome, according to common features currently defining tolerogenic DCs.

Pentraxins

Pentraxins constitute a superfamily of evolutionarily conserved multimeric and multifunctional proteins sharing an 8-amino acid “pentraxin domain” (HxCxS/TWxS, where “x” is any amino acid) in their carboxy terminus. Based on the primary structure of the promoter, pentraxins are divided into short pentraxins (CRP and SAP) and long pentraxins (PTX3) (58). Both CRP and SAP are homooligomeric proteins arranged in a ~25 kDa subunit pentameric radial symmetry and hold 51% amino acid sequence identity. They constitute the main APPs in human and mouse, respectively, are produced by hepatocytes and have wide capacity for pathogen recognition, phagocytosis, and cytokine secretion through interaction with Fc γ receptors (59). Moreover, CRP and SAP are able to regulate the activation of the complement system by interaction with C1q, ficolins, C4b-binding protein (C4BP) and factor H, favoring efferocytosis and preventing the onset of autoimmune diseases (60, 61).



C-reactive protein has been shown to transform biological functions of Mo-DCs toward a tolerogenic phenotype. Interestingly, when CRP was added at the early stage of Mo-DC differentiation from CD14⁺ monocytes, it downregulated surface expression of DC-SIGN and the antigen uptake molecules CD205 and CD206, resulting in reduced endocytosis capacity (62, 63). Moreover, LPS-mediated Mo-DC maturation was also impaired, through downregulation of co-stimulatory molecules CD80 and CD86, and of the maturation marker CD83, inhibition of allogeneic T cell proliferation and decreased production of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-8, IL-6, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , and MCP-1). These effects seemed to be mediated through the immunoreceptor Fc γ RII/CD32, which is downregulated during differentiation into Mo-DCs. Conversely, another study reported just the opposite,

that is, CRP was able to activate Mo-DCs through upregulation of DC activation markers (CD40, CD80, CD83, and CCR7) and induced allogeneic T cell proliferation and IFN- γ production (64). Nevertheless, in that case the pulsation of Mo-DCs was started at day 6 of culture, once the Mo-DCs were fully differentiated. These results evidence the restricted tolerogenic activity window characterizing CRP, at the initial steps of Mo-DC differentiation. Analogously, human SAP has been reported to bind strongly to monocytes but weakly to differentiated Mo-DCs (65). SAP also inhibits neutrophil recruitment and monocyte to fibrocyte differentiation, in part, by binding to the Fc γ Rs (66, 67), and polarizes macrophages toward an immunoregulatory phenotype through PI3K/Akt-ERK signaling (68). Thus, SAP regulates key components of the innate immune system and inflammation.

Pentraxins is a multimeric 340 kDa glycoprotein with a complex quaternary structure (elongated, with a large and a small domain interconnected by a stalk region) composed of two tetramers linked by interchain bridges to form an octamer. PTX3 expression is induced in a variety of cell types (particularly in phagocytes) by inflammatory cytokines, TLR agonists or pathogens, binds to a wide range of microorganisms, and plays a relevant role in host defense and inflammation (69), for example, by regulating leukocyte recruitment (70). Moreover, analogously to CRP and SAP, PTX3 is also able to modulate the activation of the complement system by binding C1q, ficolins, mannose-binding lectin (MBL), and the complement regulators C4BP and FH, and increases phagocytosis in an FcγRII-dependent manner. Hence, PTX3 binds to apoptotic cells and recruits C4BP, limiting complement activation and an exacerbated inflammatory response (71). In this context, PTX3 reduces the release of TNF-α and IL-10 by LPS-challenged Mo-DCs, and consistently inhibits the upregulation of membrane molecules (CD86, HLA-ABC, HLA-DR) on an inflammatory cell surface induced by LPS. Moreover, PTX3 also induces macrophages to secrete anti-inflammatory cytokines such as TGF-β and IL-10 (72), modulates LPS-induced inflammatory response and attenuates liver injury (73).

Complement Components

The evolutionarily conserved complement system, in addition to its crucial function in the innate defense against common pathogens, holds also a key regulatory non-immunogenic role in the “silent” clearance of immune complexes from the circulation and apoptotic cells from damaged tissues, in close crosstalk with the mononuclear phagocyte system (74). We have recently discussed the “non-canonical” activities of a variety of complement effectors and modulators able to transform DCs toward a tolerogenic phenotype (75). Thus, we will instead focus here on the functional outcome of a few representative complement components directly interacting with Mo-DCs.

In addition to their central role as complement cascade initiators for microbial phagocytosis and killing, it is becoming evident that both, complement cascade initiators such as mannose-binding lectin (MBL) and soluble complement inhibitors such as C4BP, are able to promote an immunomodulatory and anti-inflammatory environment by direct interaction with DCs and other immune cells.

MBL, the prototypic initiator of the lectin pathway of complement activation, belongs to the collectin family and, through its carbohydrate-recognition domains, is able to bind to oligosaccharides (mannose, *N*-acetyl-glucosamine) on the pathogen surface (76). DCs from MBL-deficient individuals showed increased IL-6 production and poor allogeneic T cell responses, features of pathogen-stimulated DCs, which could be reversed by *in vitro* addition of MBL (77). In fact MBL, at supraphysiological concentrations, influences the phenotype and function of DCs by attenuating LPS binding to immature DCs and their further maturation and pro-inflammatory cytokine production (IL-12, TNF-α), while preventing allogeneic T lymphocyte proliferation (78). Moreover, MBL not only attenuates LPS-induced Mo-DC maturation, but also affects early Mo-DC differentiation from CD14⁺ monocytes, yielding Mo-DCs with tolerogenic features

(low MHC-II, CD80 and CD40 expression, increased IL-10 and IL-6 secretion, and reduced T cell alloproliferation), and being possibly mediated by members of the STAT family (79).

Among the complement inhibitors, the regulator of the classical and lectin pathways of complement activation C4BP has a complex oligomeric structure. The major C4BP isoform, C4BP(β+), has a heterooligomeric radial structure (570 kDa). It is composed by seven identical 70 kDa modular α-chains (responsible for the complement inhibitory activity, and for pentraxin, heparin, DNA, and pathogen binding, among others), and a single 40 kDa β-chain (high-affinity binding site for anticoagulant vitamin K-dependent Protein S, allowing a strong interaction with apoptotic/necrotic cells) (80, 81). The minor C4BP isoform, C4BP α7β0 or C4BP(β-), holds the same oligomeric structure and complement inhibitory function than C4BP(β+), but lacks the β-chain. Under acute phase conditions (poly-traumatism, sepsis) the levels of circulating C4BP(β-) isoform increase significantly as a consequence of the differential hepatic regulation of the α- and β-chains by pro-inflammatory cytokines (82). Thus, C4BP(β-) is a genuine APP. We have shown that the C4BP(β-) isoform, but not the C4BP(β+) isoform, by direct interaction with Mo-DCs through as yet unknown receptor(s), only in the early stages of monocyte to Mo-DC differentiation, is able to confer an anti-inflammatory, tolerogenic phenotype to these cells, retaining a high-endocytic activity, and morphological features of immaturity. Upon LPS priming, these C4BP(β-)-treated Mo-DCs featured low-surface expression of CD83, CD80, and CD86, inhibition of pro-inflammatory IL-12, TNF-α, IFN-γ, IL-6, and IL-8 production and, instead, increased expression of anti-inflammatory IL-10 and TGF-β, reduced CCR7 expression and chemotaxis, and promoted Treg expansion. Moreover, C4BP(β-) induced tolerogenic DCs with increased viability and yield when compared with the immunomodulator vitamin D3, and similarly prevented T cell alloproliferation (83).

Although perhaps not a *bona fide* APP, C1q, the recognition unit from the classical pathway of complement activation and major component of the C1 complex, binds to various APPs including CRP, SAP, and PTX3, thereby regulating the classical complement pathway. C1q has also been recognized to modulate cellular functions within the adaptive immune response (84). Certainly, C1q has even been proposed as a tolerogenic DC marker because relevant immunomodulatory agents such as dexamethasone, IL-10, or vitamin D3 are able to induce at least a 10-fold overexpression of C1q at both mRNA and protein levels in Mo-DCs (85). The regulatory effects of C1q on monocyte/DC precursors could be mediated by gC1qR, occurring within a narrow timeframe of monocyte to Mo-DC transition and being influenced by the microenvironment. Accordingly, while in the presence of danger signals C1q would recognize and bind antigens through its globular head domains, leading to activation of a pro-inflammatory immune response in immature Mo-DCs, in the absence of danger signals C1q would maintain immature Mo-DCs in a tolerance state through gC1qR (86). Certainly, gC1qR ligation on the surface of Mo-DCs suppresses TLR4-induced IL-12 production through PI3K pathway activation (87). Furthermore, an alternative mechanism of C1q-mediated immunomodulation involves high-affinity binding between C1q and the inhibitory

immunoreceptor LAIR-1, which inhibits monocyte-to-Mo-DC differentiation (88). More recently, this interaction has been refined through the characterization of a tri-molecular engagement encompassing C1q-CD33/LAIR-1 crosslinking (89).

Hemoglobin- and Iron-Binding Proteins

Essential cellular processes, such as energy generation, DNA replication, oxygen transport, and protection from oxidative stress are dependent on iron. Since bacterial pathogens also require iron for replication and infection, iron sequestration strategies from vertebrates constitutes a significant form of nutritional innate immunity (90). Thus, in homeostatic healthy conditions iron is largely intracellular and sequestered within ferritin. Conversely, acute inflammatory processes such as infection, include the release of lactoferrin from secondary granules contained within polymorphonuclear leukocytes. Furthermore, hemoglobin released by physiological and pathological hemolysis is captured by Haptoglobin (Hp). All together, these proteins ensure a virtually free iron environment in vertebrate tissues.

Ferritin is a major tissue iron-binding protein with a molecular weight of 500 kDa, whose main function is to store iron in a soluble non-toxic form, protecting the cell from iron-mediated redox reactions. The levels of this APP remain elevated in many chronic inflammatory diseases such as periodontitis (91). Ferritin is composed of 24 subunits consisting of heavy (H) and light (L) chains, and may heterooligomerize forming isoferritins depending on the proportions of H and L chains (92). The immunosuppressive effects of cancer cell supernatants, such as melanoma supernatants, correlated with their content of H-ferritin. Accordingly, H-ferritin has been shown to inhibit anti-CD3-stimulated lymphocyte proliferation, probably mediated by increased IL-10 production (93). Importantly, H-ferritin is also able to induce a semi-mature, tolerogenic phenotype on Mo-DCs featuring increased expression of CD86 (B7-2) and B7-H1, and the activation of IL-10-producing Treg cells (94).

Lactoferrin, also known as lactotransferrin, is produced in a number of tissues and is frequently found in mucosal secretions and neutrophil secretory granules (95). This 80 kDa iron-binding glycoprotein is an important component of innate immunity, and holds a key role in the protection of mucosal surfaces from microbial infections (96). Lactoferrin also modulates innate and adaptive immune-inflammatory responses, including cytokine production, promotion of T and B cell maturation, and enhancement of delayed-type hypersensitivity against defined antigens. Moreover, it has been suggested that lactoferrin might exert adjuvant activity, enhancing DC function to promote generation of antigen-specific T cells (97). In contrast, bovine lactoferrin (bLF) seems to play an opposite role. Thus, Mo-DCs differentiated in the presence of bLF showed a fully tolerogenic or immunomodulatory behavior [potent anti-inflammatory activity, high-endocytic capacity, increased expression of molecules with negative immunoregulatory functions (ILT3, PD-L1, IDO, and SOCS3), CCL1 production, and impaired capacity to undergo activation and to promote Th1 responses]. bLF is internalized and seems to reach the nucleus, although the molecular details mediating the bLF-mediated transcriptional regulation of Mo-DC differentiation are still unknown (98, 99).

Hp is the major hemoglobin-binding protein in plasma. This APP, whose hepatic expression is induced by inflammatory mediators such as IL-6-type cytokines, interacts with free hemoglobin neutralizing and restricting its oxidative damage to various organs (100). Hp has been suggested to exert immunomodulatory effects constituent with suppression of lymphocyte function (101). During physiological and pathological hemolysis, the Hp-CD163-heme oxygenase (HO-1) pathway efficiently scavenges and circumvents hemoglobin/heme-induced toxicity. This pathway plays an anti-inflammatory role in phagocytes, and the resulting heme metabolites, such as bilirubin, reinforce its cytoprotective and anti-inflammatory efficacy (102). Hp seems also to prevent epidermal Langerhans cells from spontaneously undergoing functional maturation in the skin, inhibiting their capacity to activate autologous T cells *in vitro* (103).

Other APPs and APP-Related Proteins

Serum amyloid A is an APP produced mainly by the hepatocytes, but also by other cell types such as macrophages, smooth muscle cells, chondrocytes, epithelial cells, and adipocytes, under pro-inflammatory stimuli (58). SAA interacts with Gram-negative bacteria and, through its opsonic activity, increases their phagocytosis and the production of TNF- α and IL-10 by phagocytes (104). SAA has also been recently shown to be involved in the expression of the "alarmin" IL-33 by monocytes and macrophages (105). Notably, it has been recently shown that SAA-stimulated monocytes (HLA-DR^{hi} HVEM^{lo}) most resemble immature Mo-DCs, and are able to drive Treg proliferation (106). SAA is also a chemoattractant for immature Mo-DCs through formyl peptide receptor like 1/formyl peptide receptor 2 (107). Furthermore, mice lacking SAA3, an acutely expressed isoform found in non-primate mammals, develop metabolic dysfunction, and exacerbated pro-inflammatory responses from innate immune cells. Particularly, bone marrow-derived DCs from SAA3^(-/-) mice produce increased levels of IL-1 β , IL-6, IL-23, and TNF- α in response to LPS compared with cells from wild-type mice (108). Thus, endogenous SAA3 likely modulates metabolic and immune homeostasis.

α 1-Antitrypsin, a member of the SERPIN superfamily of protease inhibitors, is a major inhibitor of the neutrophil-derived serine proteases [neutrophil elastase (NE), cathepsin G, and proteinase 3]. It has a primary anti-inflammatory role by irreversible binding and inactivation of NE, protecting the lung against the destructive effects of NE released by degranulating neutrophils during inflammation (109). AAT is predominantly produced by the liver, and its secretion, increased under acute phase conditions, is mediated by pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and TNF- α) (12). Recent studies have reported tolerogenic activities of AAT that are difficult to explain solely by serine-protease inhibition or by its anti-inflammatory actions (110). Circulating AAT is bound to lipoprotein particles (LDL and HDL) and docks onto lipid-rafts. Thus, TLR2 and TLR4 contained in lipid-rafts from macrophages and DCs are downregulated by AAT (111). Moreover, AAT induces a tolerogenic phenotype on DCs characterized by low levels of CD40, CD86, and MHC class II, increased production of IL-10 and enhanced generation of Tregs through a so far unknown mechanism. These tolerogenic DCs maintain,

nevertheless, the inflammation-driven cell migration capacity (112). In fact, AAT monotherapy has been shown to induce tolerance in islet allograft and kidney transplantation (113, 114), graft-versus-host disease (115), improved islet function in type I diabetes (116), and attenuated lupus nephritis (117).

Fibrinogen is synthesized mainly by hepatocytes, and its level increases substantially during infections and inflammatory conditions. This 340 kDa glycoprotein, made up of two identical subunits joined together by disulfide bonds, functions as a blood coagulation factor, supporting platelet aggregation, and fibrin cloth formation at the site of vessel injury. Fibrinogen had an Mo-DC maturation effect comparable with poly I:C, TNF- α , and PGE₂, but it failed to induce IL-12 production (118). On the other hand, it has been recently reported that fibrinogen cleavage products generated by protease allergens, through induction of IL-13 production by mast cells, increased the number of Th₂-favorable (PD-L2⁺) DCs in allergic asthma (119). Interestingly, another member of the fibrinogen-related protein superfamily, soluble fibroleukin or fibrinogen-like protein 2 (sFGL2), highly inducible by IFN- γ and with features of APP, has a 50 kDa weight and is highly expressed in cytotoxic T cells and Tregs upon activation (120). sFGL2 seems to act as an immunosuppressor, repressing the proliferation of alloreactive T lymphocytes and the maturation of DCs (121, 122). Thus, by binding to Fc γ RIIB and Fc γ RIII, sFGL2 can adjust the antigen presentation ability of APCs. Accordingly, the levels of Th₂ cytokines and the activity of DCs have found to be increased in FGL2-deficient mice (123).

IMMUNOTHERAPEUTIC POTENTIAL OF APPs FOR TOLEROGENTIC DC INDUCTION

Pharmacological immunosuppression has gone mainstream of past and, still, current therapeutic strategies to prevent transplant rejection and to restore autoantigen tolerance in autoimmune disorders. Yet, the downside of the immunosuppressive regimens is the appearance of numerous and often severe side effects and increased risk of infection as a consequence of the general suppression of the host immune system (124–126). Thus, the attractive concept of using DCs, central orchestrators of other immune cells, with the aim to modulate immune-inflammatory responses that have gone awry while leaving protective immunity intact is becoming gradually a reality in the clinical setting. In fact, in addition to being explored in experimental animal models of autoimmune diseases such as collagen-induced arthritis (127, 128), diabetes (129, 130), and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (131), along with experimental graft rejection after transplantation (132, 133), tolerogenic DCs have recently been, and are currently being tested in phase I clinical trials for alloimmune (transplantation, graft-versus-host disease) and autoimmune processes (type I diabetes, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and Crohn's disease), and allergy, and there are ongoing collaborative efforts to harmonize/standardize tolerance-inducing therapies for upcoming trials (134–136).

The identification, characterization and, most notably, isolation and amplification of genuine regulatory or tolerogenic DCs

populating a given healthy or diseased tissue, much like MDSCs, has proven a daunting task and a real limitation when planning to adoptively transfer them for therapeutic benefit. Therefore, due to the high plasticity of mononuclear myeloid cells such as monocytes, well-established *ex vivo* protocols of monocyte to Mo-DC expansion and differentiation, relying in the use of inflammatory cytokines (GM-CSF and IL-4) have become instrumental to adopt Mo-DCs as therapeutic cell products for clinical use (137).

A central aspect for the successful clinical application of tolerogenic Mo-DC relates to their development and manufacture. As previously stated, a variety of agents have been employed *in vitro* to skew Mo-DCs toward a tolerogenic or regulatory phenotype (notably vitamin D₃, immunosuppressive drugs-like dexamethasone, or NF- κ B inhibitors), opposing their “natural” tendency to be activated *in vivo* in a pro-inflammatory environment. Yet limited efficacy has been reported in terms of disease outcome, although most trials have noted an increase in Treg levels in the recipient's blood during tolerogenic Mo-DC administration (138–140). Clearly, maintaining tolerogenic Mo-DCs in an activation- or maturation-resistant state is a fundamental requirement for a successful tolerogenic Mo-DC therapy, because unstable tolerogenic Mo-DCs able to reverse back *in vivo* to an immunogenic phenotype in contact with a pro-inflammatory microenvironment could aggravate the pathology. Indeed, semi-mature DCs, considered tolerogenic in *in vitro* assays, may become immunogenic when administered *in vivo* (141, 142). Furthermore, it has been recently reported that continuous treatment of DCs during their differentiation from bone marrow cells (10-day treatment) with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid generated tolerogenic DCs that, however, were not stable and, therefore, inefficacious when administered in mice with EAE (143). Hence, the possibility to anticipate and modulate the stability of tolerogenic Mo-DCs *in vivo*, particularly in the pro-inflammatory allo- or autoimmune environments in which these cells are applied, would enhance their therapeutic efficacy. As yet, there is not enough mechanistic knowledge to ascertain which stimuli guarantee the induction of stable tolerogenic Mo-DCs adapted to particular *in vivo* situations. Still, in tolerogenic Mo-DC conditioning protocols, establishing the appropriate timing and intensity of the tolerogenic reagent treatment, its toxicity, as well as the migration capacity of the resulting conditioned cells are crucial aspects to take into account for a successful Mo-DC-based immunotherapy (134). For example, both rapamycin- and dexamethasone-conditioned cell cultures have been shown to markedly reduce DC recovery (144, 145). Importantly, none of the APPs proved cytotoxic in the Mo-DC cultures, most likely because of the wide range of physiological concentrations that these proteins are able to reach in serum, fluctuating between homeostatic and acute phase conditions. Thus, APP-derived tolerogenic Mo-DCs might overcome some of the limitations of the current tolerogenic Mo-DCs employed for immunotherapy approaches regarding consistency, safety, and efficacy (124, 146).

On the other hand, the common tolerogenic moonlighting activity of APPs over Mo-DCs seems surprising, given the variety of different physiological functions ascribed to these proteins. Remarkably, nearly all of them share a complex, oligomeric, and

TABLE 1 | Immunomodulatory actions of acute phase proteins (APPs) on dendritic cells (DCs).

APP	Structural information	Canonical function	Tolerogenic activity	Reference
Soluble pattern recognition molecules				
Pentraxins				
C-reactive protein	Amular, ring-shaped, pentameric protein (~125 kDa)	Activation of the complement system Pathogen protection	CD209 \downarrow , CD40 \downarrow , CD83 \downarrow , CD80 \downarrow , CD86 \downarrow Endocytosis \downarrow IL-12 \downarrow , MCP-1 \downarrow , TNF- α \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , MIP-1 α \downarrow , MIP-1 β \downarrow Alogeneic T lymphocyte proliferation \downarrow	(62, 63)
Serum amyloid P	Amular, ring-shaped, pentameric protein (~125 kDa)	Activation of the complement system Binding to fibrils and amyloid deposits Pathogen protection	IL-12 \downarrow , IL-10 \uparrow	(65, 66, 68)
Pentraxin 3	Cyclic multimeric structure. Complex quaternary structure composed of two tetramers linked by interchain bridges to form an octamer (~340 kDa). Proposed stabilized decameric protein (~450 kDa)	Activation of the complement system Pathogen protection	CD86 \downarrow , HLA-ABC \downarrow , HLA-DR \downarrow TNF- α \downarrow , IL-10 \downarrow , TGF- β \uparrow	(72, 73)
Serum amyloid A	Oligomeric apolipoprotein. Probably trimeric (~35 kDa) or hexameric structure (~70 kDa)	Cholesterol transport	HLA-DR \uparrow , HVEM \downarrow IL-1 β \uparrow , IL-6 \uparrow Treg generation \uparrow	(106)
Complement components				
Mannose-binding lectin	Oligomer (400–700 kDa). Tetrameric structure build of subunits containing three presumably identical peptide chains	Activation of the lectin pathway of complement	CD40 \downarrow , CD80 \downarrow IL-12 \downarrow , TNF- α \downarrow , IL-10 \downarrow , IL-6 \downarrow Alogeneic T lymphocyte proliferation \downarrow	(78, 79)
C4b-binding protein (C4BP(beta))	Oligomeric radial structure composed of seven identical α -chains (~520 kDa)	Inhibition of the classical pathway of complement	CD83 \downarrow , CD80 \downarrow , CD86 \downarrow IL-12 \downarrow , TNF- α \downarrow , IFN- γ \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , IL-10 \downarrow , TGF- β \uparrow Th1 proliferation \downarrow Treg generation \uparrow	(83)
Antiproteases				
α 1-antitrypsin	Monomer (52 kDa)	Serine-protease inhibition	CD40 \downarrow , CD86 \downarrow , MHC-II \downarrow TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , IL-12 \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-10 \downarrow , CCR7 \uparrow Alogeneic T lymphocyte proliferation \downarrow Treg generation \uparrow	(112–117)
Toxin binding/transport				
Haptoglobin	Preprotein processed to yield both α - and β -chains, which combine to form a tetramer (~100 kDa), or polymerize (~900 kDa), depending on its phenotype	Free plasma hemoglobin binding	MHC-II \downarrow , MHC-III \downarrow , B7 \downarrow , CD40 \downarrow IL-12 \downarrow Autologous, naive T cell activation \downarrow	(103)
Hemostasis				
Fibrinogen	Composed of three non-identical pairs of disulfide-bonded chains (~340 kDa)	Blood clotting	CD83 \downarrow , CD86 \downarrow IL-12 \downarrow Alogeneic T lymphocyte proliferation \downarrow	(118)

(Continued)

TABLE 1 | Continued

APP	Structural information	Canonical function	Tolerogenic activity	Reference
Binding/transport of essentials				
Ferritin	Mixture of oligomers. Forms 24-mers (~480 kDa)	Iron storage and transport	CD861, B7-H1↑ IL-10-producing Treg generation†	(94)
Other APP-related proteins				
Fibrinogen-like protein 2	Oligomer consisting of four monomers (~200 kDa). Structure homologous to fibrinogen and tenascin	Membrane-bound FGL2: thrombosis Soluble FGL2: immunomodulation	CD801, MHC-II↑ IL-2↑, IFN-γ↑, IL-4↑, IL-10↑ Allogeneic T lymphocyte proliferation↓	(121–123)
Lactoferrin	Globular glycoprotein (~75–80 kDa). Forms two homologous globular domains. In secretory fluids exists predominantly in tetrameric form	Transfer of iron to the cells. Control of the level of free iron in the blood	DC-SIGN↑, MFI, CD801, CD861, and HLA-DR↑, PD-L1↑, IL73↑ Endocytosis IL-6↑, IL-12↓, TNF↑, IL-23↓ IL-10↓, CCL2↓, CCL11↑ Allogeneic T lymphocyte proliferation↓	(98, 99)

multi-modular structure (Table 1), providing flexibility in their capacity for binding, with a different grade of specificity, a variety of humoral and/or cellular determinants, including different receptors in the surface of Mo-DCs. This feature might constitute an advantage for the fine-tuning of the desired tolerogenic phenotype on Mo-DCs.

Another key aspect of APP action, as outlined in previous sections, relates to the simultaneous presence and increased levels of both APPs and Mo-DCs under overwhelming immune-inflammatory conditions such as the acute phase response, which incites a physiological crosstalk between these humoral (APPs) and cellular (Mo-DCs) systems with the common goal of providing protection and progress toward the resolution of inflammation. In this regard, APPs probably contribute *in vivo* to mononuclear phagocyte switching toward an anti-inflammatory mode aimed at restoration of tissue integrity and function. Consequently, the APP interaction with Mo-DCs will be safer and effective over a wide range of concentrations, according to the significantly increased blood levels reached by APPs under acute phase conditions. On the other hand, most APPs have been shown to act over a narrow window within the Mo-DC differentiation and/or maturation program, limiting also their hypothetical toxicity, if any, and increasing their specificity compared with some of the current immunosuppressive/immunomodulatory agents, which need to be present over the full differentiation/maturation program to induce a tolerogenic outcome into Mo-DCs. Furthermore, several APPs and, particularly, all soluble PRMs, operate only in the early stages of monocyte to Mo-DC differentiation, while IL-10, for example, is active on Mo-DCs up to their terminal differentiation, when Mo-DCs downregulate the IL-10 receptor (147). This restricted activity of APPs at the beginning of the Mo-DC differentiation program may induce a more permanent and stable modification of the Mo-DC tolerogenic phenotype than that achieved by immunomodulators/immunosuppressors influencing Mo-DCs late in their differentiation process, or by agents affecting only their maturation/activation status. These last agents may be more prone to be influenced by the pro-inflammatory microenvironment that the tolerogenic Mo-DCs face upon clinical administration. Comparing the performance and outcome of *in vitro* assays, APPs seem to hold a tolerogenic activity over Mo-DCs (low expression of co-stimulatory molecules, low production of pro-inflammatory cytokines, increased release of anti-inflammatory cytokines, low T cell alloproliferation and, instead, increased Treg generation, etc.) at least as efficient as the agents (rapamycin, dexamethasone and/or vitamin D₃, NF-κB inhibitors, etc.) currently employed to generate clinical-grade tolerogenic Mo-DCs for the induction or restoration of immune tolerance in autoimmune pathologies and transplantation (148). Furthermore, given the broadened presence that APPs can reach in serum under acute phase conditions and the present hurdles facing adoptive DC-based immunotherapy (time-consuming, expensive, and arduous to implement in the current regulatory environment), the direct *in vivo* administration of APPs, either naked or complexed with nanoparticles, may become a useful and efficacious alternative in inflammatory pathologies. In fact, nanoparticle formulations for DC-specific receptor targeting (DEC205, DC-SIGN, CD40, CD11c, etc.) are being used in

preclinical assays and phase I clinical trials as vaccines for onco-immunotherapy (149–151).

Nevertheless, presently the most important drawback for the use of APPs as tolerogenic agents lies in the fact that the detailed molecular mechanisms of action of APP-mediated transformation of Mo-DCs toward a tolerogenic phenotype are not known for most of these proteins. Thus, current efforts employing high-throughput genomics and proteomics approaches will certainly dissect cell surface-interacting partner(s) and relevant signaling and metabolic pathways underlying APP-mediated programming and distinctive functional outcome of the ensuing tolerogenic Mo-DCs (152, 153).

CONCLUSION AND PROSPECTS

For a successful tolerogenic immunotherapy, Mo-DC conditioning must regulate antigen-specific immune responses in the intrinsically complex pro-inflammatory environments evolving in autoimmune disorders and transplantation, sustaining the development of immunological memory toward tolerance. Thus, it is critically important to thoroughly test the performance of novel tolerance-inducing agents regarding the potency and durability of the ensuing tolerogenic Mo-DC phenotype.

Besides being proposed as useful biomarkers for a variety of inflammatory pathologies, recent studies have proposed that APPs play important roles in tissue homeostasis and repair following overwhelming immune-inflammatory processes, probably in close interaction with inflammatory monocytes and DCs. In fact, APPs are able to generate tolerogenic Mo-DCs *in vitro* with the desired regulatory features (increased expression of immunomodulatory molecules, enhanced production of anti-inflammatory cytokines, and Treg generation) and low immunogenicity (Table 1), comparable with the currently used clinical tolerogenic Mo-DC-inducing immunomodulatory/immunosuppressive agents. Although the precise mechanism of action of tolerogenic Mo-DC skewing induced by most APPs is still unknown, these proteins may prove useful alternatives to overcome the present limitations for a more efficacious, safe, and stable Mo-DC-based tolerogenic immunotherapy. In this regard, attractive attributes of APPs include a physiological basis regarding their interaction with Mo-DCs in the context of the acute phase response, and a wide range of action due to the own intrinsic features of APPs, which would ensure reduced toxicity at the cellular level and increased safety upon *in vivo* administration. Moreover, the narrow activity window in the early stages of monocyte to Mo-DC differentiation shown by

several APPs, notably soluble PRMs, should increase specificity and, more importantly, may contribute to a more stable tolerogenic phenotype. APPs targeting differentiating Mo-DCs could turn these cells unresponsive to the *in vivo* pro-inflammatory microenvironment present in autoimmune or alloimmune conditions and, therefore, refractory to Mo-DC maturation. Furthermore, taking into account novel findings, such as the proteomic characterization of tissue-/disease-specific posttranslational modifications of APPs (14), or the influence of the clinical status of the Mo-DC recipient (154) may fine-tune the tolerogenic potential of APP-treated Mo-DCs, e.g., their ability to modulate T cell responses. Nevertheless, additional research should help clarify whether some APPs, particularly pentraxins, or complement activators, are able to maintain their induced tolerogenic DCs in a stable and functional state upon administration in complex pathological tissue contexts, because of the dual protective and pro-inflammatory role played by these multifaceted molecules in physiology.

Definitely, although further work is warranted to establish which method, or perhaps combination of methods, is most suitable to generate tolerogenic Mo-DCs in the clinical setting, APPs may contribute, either on their own, combined with currently employed immunomodulators/immunosuppressants (155), and/or with recently proposed tolerogenic DC boosters such as minocycline (156), or reinforcing the tolerogenic properties of iPSC-derived CD141⁺ DCs holding enhanced capacity for antigen cross-presentation (157), to the design of tailored protocols to induce or re-establish immunological tolerance in different clinical settings including allogeneic transplantation and autoimmune diseases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JA wrote the manuscript. IS and AL added additional insights. The final version was proofread and edited by all authors.

FUNDING

JA received support from Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, Spain) [grants FIS-ISCIPII PI13/01490 and PI16/00377, co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-a way to build Europe-], from “La Marató de TV3” Foundation (grant 12/1210), and from Generalitat de Catalunya (grant 2014SGR541). JA is sponsored by the “Researchers Consolidation Program” from the SNS-Dpt. Salut Generalitat de Catalunya (Exp. CES06/012).

REFERENCES

- Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* (2003) 5(5):661–74. doi:10.1002/emmm.201202382
- Jakubczik CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol* (2017) 17(6):349–62. doi:10.1038/nri.2017.28
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (1998) 392(6673):245–52. doi:10.1038/32588
- Banchereau J, Pacesny S, Blanco P, Bennet L, Pascual V, Fay J, et al. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 987:180–7. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb06047.x
- Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* (2007) 28(5):227–33. doi:10.1016/j.it.2007.03.008
- Gregori S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens* (2011) 77(4):89–99. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01615.x
- Whicher JT, Westacott CI. The acute phase response. In: Whicher JT, Evans SW, editors. *Biochemistry of Inflammation* Boston: Kluwer Academic Publishers (1992). vol. 18, p. 243–69.
- Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000* (2000) 23(1):19–49. doi:10.1034/j.1600-0757.2000.2230103.x
- Crispe IN. Hepatocytes as immunological agents. *J Immunol* (2016) 196(1): 17–21. doi:10.4049/jimmunol.1501668

10. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* (1999) 340(6):448–54. doi:10.1056/NEJM199902113400607
11. Parrow NL, Fleming RE, Minnick MF. Sequestration and scavenging of iron in infection. *Infect Immun* (2013) 81(10):3503–14. doi:10.1128/IAI.00602-13
12. Baumann H, Gaudie J. The acute phase response. *Immunol Today* (1994) 15(2):74–80. doi:10.1016/0167-5699(94)90137-6
13. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* (1995) 332(20):1351–62. doi:10.1056/NEJM199505183322008
14. Schrödl W, Büchler R, Wendler S, Reinhold P, Muckova P, Reindl J, et al. Acute phase proteins as promising biomarkers: perspectives and limitation for human veterinary medicine. *Proteomics Clin Appl* (2016) 10(11):1077–92. doi:10.1002/prca.201600028
15. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* (2009) 78(6):539–52. doi:10.1016/j.bcp.2009.04.029
16. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* (1989) 44:153–205. doi:10.1016/S0065-2776(08)60642-2
17. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* (1990) 265(3):621–36. doi:10.1042/bj2650621
18. Sehgal PB, Greininger G, Tosato G. Acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann N Y Acad Sci* (1989) 557:1–583.
19. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* (1994) 179(4):1109–18. doi:10.1084/jem.179.4.1109
20. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* (1999) 11(6):753–61. doi:10.1016/S1074-7613(00)80149-1
21. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* (2013) 34(9):440–5. doi:10.1016/j.it.2013.06.001
22. Askew MH, Han SJ, Byrd AL, Morais da Fonseca D, Bouladoux N, Wilhelm C, et al. Bone-marrow-resident NK cells prime monocytes for regulatory function during infection. *Immunity* (2015) 42(6):1130–42. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.011
23. Tamoutounour S, Guilliams M, Sanchis F, Liu H, Terhost D, Malosse C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* (2013) 39(5):925–38. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.004
24. Campbell IK, van Nieuwenhuijze A, Segura E, O'Donnell K, Coghill E, Hommel M, et al. Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF- κ B-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *J Immunol* (2011) 186(9):5468–77. doi:10.4049/jimmunol.1002923
25. Schmid MA, Harris E. Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog* (2014) 10(12):e1004541. doi:10.1371/journal.ppat.1004541
26. Van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, Begieneman MP, Krijnen PA, Hirsh A, et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J* (2014) 35(6):376–85. doi:10.1093/eurheartj/eh331
27. Clements M, Gershenovich M, Chaber C, Campos-Rivera J, Du P, Zhang M, et al. Differential Ly6C expression after renal ischemia-reperfusion identifies unique macrophage populations. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27(1):159–70. doi:10.1681/ASN.2014111138
28. Liaskou E, Zimmermann HW, Li KK, Oo YH, Suresh S, Stamataki Z, et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* (2013) 57(1):385–98. doi:10.1002/hep.26016
29. Jung H, Mithal DS, Park JE, Miller RJ. Localized CCR2 activation in the bone marrow niche mobilizes monocytes by desensitizing CXCR4. *PLoS One* (2015) 10(6):e0128387. doi:10.1371/journal.pone.0128387
30. Thiesen S, Janciauskiene S, Uronen-Hansson H, Agace W, Högerkorp CM, Spee P, et al. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J Leukoc Biol* (2014) 95(3):531–41. doi:10.1189/jlb.0113021
31. Serti E, Werner JM, Chattergoon M, Cox AL, Lohmann V, Reherrmann B. Monocytes activate natural killer cells via inflammasome-induced interleukin 18 in response to hepatitis C virus replication. *Gastroenterology* (2014) 147(1):209–20.e3. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.046
32. Chow KV, Sutherland RM, Zhan Y, Lew AM. Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Cell Biol* (2017) 95(3):244–51. doi:10.1038/icb.2016.104
33. Croxford AL, Lanzinger M, Hartmann FJ, Schreiner B, Mair F, Pelczar P, et al. The cytokine GM-CSF drives the inflammatory signature of CCR2+ monocytes and licenses autoimmunity. *Immunity* (2015) 43(3):502–14. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.010
34. Morias Y, Abels C, Laoui D, Van Overmeire E, Guilliams M, Schoupe E, et al. Ly6C- monocytes regulate parasite-induced liver inflammation by inducing the differentiation of pathogenic Ly6C+ monocytes into macrophages. *PLoS Pathog* (2015) 11(5):e1004873. doi:10.1371/journal.ppat.1004873
35. Misharin AV, Cuda CM, Saber R, Turner JD, Gierut AK, Haines GK, et al. Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Rep* (2014) 9(2):591–604. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.032
36. Peng Y, Latchman Y, Elkon KB. Ly6C (low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerate T cells through PDL-1. *J Immunol* (2009) 182(5):2777–85. doi:10.4049/jimmunol.0803172
37. Syme R, Glück S. Generation of dendritic cells: role of cytokines and potential clinical application. *Transfus Apher Sci* (2001) 24(2):117–24. doi:10.1016/S1473-0502(01)00005-2
38. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiochia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* (2013) 38(2):336–48. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.018
39. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* (2007) 179(11):7577–84. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7577
40. León B, López-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* (2007) 26(4):519–31. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.017
41. Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, et al. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol* (2009) 10(4):394–402. doi:10.1038/ni.1707
42. Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamati DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* (2010) 143(3):416–29. doi:10.1016/j.cell.2010.09.039
43. Bonasio R, Scimone ML, Schaefer P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* (2006) 7(10):1092–100. doi:10.1038/ni1106-1234b
44. Takenaka MC, Quintana FJ. Tolerogenic dendritic cells. *Semin Immunopathol* (2017) 39(2):113–20. doi:10.1007/s00281-016-0587-8
45. Iberg CA, Jones A, Hawiger D. Dendritic cells as inducers of peripheral tolerance. *Trends Immunol* (2017) 38(11):793–804. doi:10.1016/j.it.2017.07.007
46. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* (2001) 194(6):769–79. doi:10.1084/jem.194.6.769
47. Riquelme P, Geissler EK, Hutchinson JA. Alternative approaches to myeloid suppressor cell therapy in transplantation: comparing regulatory macrophages to tolerogenic DCs and MDSCs. *Transplant Res* (2012) 1(17):1–14. doi:10.1186/2047-1440-1-17
48. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cell. *Adv Immunol* (2010) 108:111–65. doi:10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5
49. Sim WJ, Ahl PJ, Connolly JE. Metabolism is central to tolerogenic dendritic cell function. *Mediators Inflamm* (2016) 2016:2636701. doi:10.1155/2016/2636701
50. García-González P, Ubilla-Olquín G, Catalán D, Schinnerling K, Aguillón JC. Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* (2016) 15(11):1071–80. doi:10.1016/j.autrev.2016.07.032
51. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* (1997) 159(10):4772–80.

52. Anderson AE, Sayers BL, Haniffa MA, Swan DJ, Diboll J, Wang XN, et al. Differential regulation of naive and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* (2008) 84(1):124–33. doi:10.1189/jlb.1107744
53. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol* (2004) 16(2):127–34. doi:10.1016/j.smim.2003.12.008
54. Anderson AE, Swan DJ, Wong OY, Buck M, Eltherington O, Harry RA, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4+ T cells partly via transforming growth factor- β 1. *Clin Exp Immunol* (2017) 187(1):113–23. doi:10.1111/cei.12870
55. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* (2012) 53(1–3):41–57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
56. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PLoS One* (2012) 7(10):e47209. doi:10.1371/journal.pone.0047209
57. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, Beraza N, Linke RP, Müller M, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* (2010) 207(7):1453–64. doi:10.1084/jem.20091474
58. Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Matovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol* (2010) 28:157–83. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101305
59. Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of Fc γ 3R by innate pentraxins. *Nature* (2008) 456(7224):989–92. doi:10.1038/nature07468
60. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* (2000) 192(9):1353–64. doi:10.1084/jem.192.9.1353
61. Familian A, Zwart B, Huisman HG, Rensink I, Roem D, Hordijk PL, et al. Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells. *J Immunol* (2001) 167(2):647–54. doi:10.4049/jimmunol.167.2.647
62. Zhang R, Becnel L, Li M, Chen C, Yao Q. C-reactive protein impairs human CD14+ monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function. *Eur J Immunol* (2006) 36(11):2993–3006. doi:10.1002/eji.200635207
63. Jimenez RV, Wright TT, Jones NR, Wu J, Gibson AW, Szalai AJ. C-reactive protein impairs dendritic cell development, maturation, and function: implications for peripheral tolerance. *Front Immunol* (2018) 9:372. doi:10.3389/fimmu.2018.00372
64. Van Vrè EA, Bult H, Hoymans VY, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Bosmans JM. Human C-reactive protein activates monocyte-derived dendritic cells and induces dendritic cell-mediated T-cell activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2008) 28(3):511–8. doi:10.1161/ATVBAHA.107.157016
65. MacDonald SL, Kilpatrick DC. Human serum amyloid P component binds to peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol* (2006) 64(1):48–52. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01774.x
66. Castaño AP, Lin SL, Surowy T, Nowlin BT, Turlapati SA, Patel T, et al. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc γ 3R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Sci Transl Med* (2009) 1(5):5ra13. doi:10.1126/scitranslmed.3000111
67. Crawford JR, Pilling D, Gomer RH. Fc γ 1R mediates serum amyloid P inhibition of fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol* (2012) 92(4):699–711. doi:10.1189/jlb.0112033
68. Zhang W, Xu W, Xiong S. Macrophage differentiation and polarization via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-ERK signaling pathway conferred by serum amyloid P component. *J Immunol* (2011) 187(4):1764–77. doi:10.4049/jimmunol.1002315
69. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fc γ receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood* (2010) 116(24):5170–80. doi:10.1182/blood-2009-12-258376
70. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* (2010) 11(4):328–34. doi:10.1038/ni.1854
71. Braunschweig A, Józsi M. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS One* (2011) 6(8):e23991. doi:10.1371/journal.pone.0023991
72. Ortega-Hernandez OD, Bassi N, Shoenfeld Y, Anaya JM. The long pentraxin 3 and its role in autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* (2009) 39(1):38–54. doi:10.1016/j.semarthrit.2008.03.006
73. Perea L, Coll M, Sanjurjo L, Blaya D, Taghdouini AE, Rodrigo-Torres D, et al. Pentraxin-3 modulates lipopolysaccharide-induced inflammatory response and attenuates liver injury. *Hepatology* (2017) 66(3):953–68. doi:10.1002/hep.29215
74. Freely S, Kemper C, Le Fric G. The “ins and outs” of complement-drive immune responses. *Immunol Rev* (2016) 274(1):16–32. doi:10.1111/imr.12472
75. Luque A, Serrano I, Aran JM. Complement components as promoters of immunological tolerance in dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol* (2017) S1084-9521(17):30131–3. doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.022
76. Ip WK, Takahashi K, Ezekowith RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* (2009) 230(1):9–21. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x
77. Dean MM, Flower RL, Eisen DP, Minchinton RM, Hart DN, Vuckovic S. Mannose-binding lectin deficiency influences innate and antigen-presenting functions of blood myeloid dendritic cells. *Immunology* (2011) 132(2):296–305. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03365.x
78. Wang M, Zhang Y, Chen Y, Zhang L, Lu X, Chen Z. Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. *BMC Immunol* (2011) 12:1. doi:10.1186/1471-2172-12-1
79. Xu XY, Li HJ, Zhang LY, Lu X, Zuo DM, Shan GQ, et al. Mannan-binding lectin at supraphysiological concentrations inhibits differentiation of dendritic cells from human CD14+ monocytes. *Microbiol Immunol* (2015) 59(12):724–34. doi:10.1111/1348-0421.12337
80. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein—friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol* (2004) 40(18):1333–46. doi:10.1016/j.molimm.2003.12.002
81. Ermer D, Blom AM. C4b-binding protein: the good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett* (2016) 169:82–92. doi:10.1016/j.imlet.2015.11.014
82. Criado-García O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J Immunol* (1995) 155(8):4037–43.
83. Olivar R, Luque A, Naranjo-Gómez M, Quer J, García de Frutos P, Borrás FE, et al. The α 7 β 0 isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J Immunol* (2013) 190(6):2857–72. doi:10.4049/jimmunol.1200503
84. Ghebrehiet B, Hosszu KH, Peerschke EI. C1q as an autocrine and paracrine regulator of cellular functions. *Mol Immunol* (2017) 84:26–33. doi:10.1016/j.molimm.2016.11.003
85. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129(4):1020–30. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.014
86. Hosszu KK, Santiago-Schwarz F, Peerschke EI, Ghebrehiet B. Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate Immun* (2010) 16(2):115–27. doi:10.1177/1753425909339815
87. Waggoner SN, Cruise MW, Kassel R, Hahn YS. gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol* (2005) 175(7):4706–14. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4706
88. Son M, Santiago-Schwarz F, Al-Abed Y, Diamond B. C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(46):E3160–7. doi:10.1073/pnas.1212753109
89. Son M, Diamond B, Volpe BT, Aranow CB, Mackay MC, Santiago-Schwarz F. Evidence for C1q-mediated crosslinking of CD33/LAIR-1 inhibitory immunoreceptors and biological control of CD33/LAIR-1 expression. *Sci Rep* (2017) 7(270):1–13. doi:10.1038/s41598-017-00290-w
90. Weinberg ED. Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1790(7):600–5. doi:10.1016/j.bbagen.2008.07.002

91. Chakraborty S, Tewari S, Sharma RK, Narula SC. Effect of non-surgical periodontal therapy on serum ferritin levels: an interventional study. *J Periodontol* (2014) 85(5):688–96. doi:10.1902/jop.2013.130107
92. Theil EC. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* (1987) 56:289–315. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.001445
93. Gray CP, Franco AV, Arosio P, Hersey P. Immunosuppressive effects of melanoma-derived heavy-chain ferritin are dependent on stimulation of IL-10 production. *Int J Cancer* (2001) 92(6):843–50. doi:10.1002/ijc.1269
94. Gray CP, Arosio P, Hersey P. Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood* (2002) 99(9):3326–34. doi:10.1182/blood.V99.9.3326
95. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* (2002) 80(1):1–6. doi:10.1139/o01-212
96. Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol* (2009) 24(5):411–6. doi:10.1111/j.1399-302X.2009.00537.x
97. Hwang SA, Actor JK. Lactoferrin modulation of BCG-infected dendritic cell functions. *Int Immunol* (2009) 21(10):1185–97. doi:10.1093/intimm/dxp084
98. Puddu P, Latorre D, Carollo M, Catizone A, Ricci G, Valenti P, et al. Bovine lactoferrin counteracts toll-like receptor mediated activation signals in antigen presenting cells. *PLoS One* (2011) 6(7):e22504. doi:10.1371/journal.pone.0022504
99. Latorre D, Pulvirenti N, Covino DA, Varano B, Purificato C, Rainaldi G, et al. Bovine lactoferrin-induced CCL1 expression involves distinct receptors in monocyte-derived dendritic cells and their monocyte precursors. *Toxins (Basel)* (2015) 7(12):5472–83. doi:10.3390/toxins7124897
100. Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* (1997) 35(9):647–54.
101. Huntoon KM, Wang Y, Eppolito CA, Barbour KW, Berger FG, Shrikant PA, et al. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol* (2008) 84(1):170–81. doi:10.1189/jlb.0208100
102. Thomsen JH, Etzerodt A, Svendsen P, Moestrup SK. The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid Med Cell Longev* (2013) 2013:523652. doi:10.1155/2013/523652
103. Xie Y, Li Y, Zhang Q, Stiller MJ, Wang CL, Streilein JW. Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. *J Dermatol Sci* (2000) 24(1):25–37. doi:10.1016/S0923-1811(00)00078-5
104. Shah C, Hari-Dass R, Raynes JG. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* (2006) 108(5):1751–7. doi:10.1182/blood-2005-11-011932
105. Sun L, Zhu Z, Cheng N, Yan Q, Ye RD. Serum amyloid A induces interleukin-33 expression through an IRE7-dependent pathway. *Eur J Immunol* (2014) 44(7):2153–64. doi:10.1002/eji.201344310
106. Nguyen KD, Macaubas C, Truong P, Wang N, Hou T, Yoon T, et al. Serum amyloid A induces mitogenic signals in regulatory T cells via monocyte activation. *Mol Immunol* (2014) 59(2):172–9. doi:10.1016/j.molimm.2014.02.011
107. Gouwy M, De Buck M, Pörtner N, Opendakker G, Proost P, Struyf S, et al. Serum amyloid A chemoattracts immature dendritic cells and indirectly provokes monocyte chemotaxis by induction of cooperating CC and CXC chemokines. *Eur J Immunol* (2015) 45(1):101–12. doi:10.1002/eji.201444818
108. Ather JL, Poynter ME. Serum amyloid A3 is required for normal weight and immunometabolic function in mice. *PLoS One* (2018) 13(2):e0192352. doi:10.1371/journal.pone.0192352
109. Korkmaz B, Poutrain P, Hazouard E, de Monte M, Attucci S, Gauthier FL. Competition between elastase and related proteases from human neutrophil for binding to alpha1-protease inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2005) 32(6):553–9. doi:10.1165/rncmb.2004-0374OC
110. Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 321(3):592–600. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.123
111. Nita IM, Serapinas D, Janciauskiene SM. α 1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* (2007) 39(6):1165–76. doi:10.1016/j.biocel.2007.02.017
112. Ozeri E, Mizrahi M, Shahaf G, Lewis EC. A-1 antitrypsin promotes semi-mature, IL-10-producing and readily migrating tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* (2012) 189(1):146–53. doi:10.4049/jimmunol.1101340
113. Lewis EC, Mizrahi M, Toledano M, Defelice N, Wright JL, Churg A, et al. α 1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(42):16236–41. doi:10.1073/pnas.0807627105
114. Chen G, Li J, Chen L, Lai X, Qiu J. α 1-Antitrypsin-primed tolerogenic dendritic cells prolong allograft kidney transplant survival in rats. *Int Immunopharmacol* (2016) 31:216–21. doi:10.1016/j.intimp.2015.12.038
115. Tawara I, Sun Y, Lewis EC, Toubai T, Evers R, Nieves E, et al. Alpha-1-antitrypsin monotherapy reduces graft-versus-host disease after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(2):564–9. doi:10.1073/pnas.1117665109
116. Gottlieb PA, Alkanani AK, Michels AW, Lewis EC, Shapiro L, Dinarello CA, et al. α 1-Antitrypsin therapy downregulates toll-like receptor-induced IL-1 β responses in monocytes and myeloid dendritic cells and may improve islet fusion in recently diagnosed patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99(8):E1418–26. doi:10.1210/10.1210/jc.2013-3864
117. Elshikha AS, Lu Y, Chen MJ, Akbar M, Zeumer L, Ritter A, et al. Alpha 1 antitrypsin inhibits dendritic cell activation and attenuates nephritis in a mouse model of lupus. *PLoS One* (2016) 11(5):e0156583. doi:10.1371/journal.pone.0156583
118. Tobiášová-Czetoová Z, Palmborg A, Lundqvist A, Karlsson G, Adamson L, Bartunková J, et al. Effects of human plasma proteins on maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Lett* (2005) 100(2):113–9. doi:10.1016/j.imlet.2005.03.009
119. Cho M, Lee JE, Lim H, Shin HW, Khalmuratova R, Choi G, et al. Fibrinogen cleavage products and toll-like receptor 4 promote the generation of programmed cell death 1 ligand 2-positive dendritic cells in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2017) S0091-6749(17):31582–8. doi:10.1016/j.jaci.2017.09.019
120. Shalev I, Wong KM, Foerster K, Zhu Y, Chan C, Maknoja A, et al. The novel CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. *Hepatology* (2009) 49(2):387–97. doi:10.1002/hep.22684
121. Chan CW, Kay LS, Khadaroo RG, Chan MW, Lakatoo S, Young KJ, et al. Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* (2003) 170(8):4036–44. doi:10.4049/jimmunol.170.8.4036
122. Liu H, Shalev I, Manuel J, He W, Leung E, Crookshank J, et al. The FGL2-Fc γ RIIB pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression. *Eur J Immunol* (2008) 38(11):3114–26. doi:10.1002/eji.200838338
123. Shalev I, Liu H, Kosciak C, Bartzak A, Javadi M, Wong KM, et al. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol* (2008) 180(1):249–60. doi:10.4049/jimmunol.180.1.249
124. Hilkens CM, Isaacs JD. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where we are now? *Clin Exp Immunol* (2013) 172(2):148–57. doi:10.1111/cei.12038
125. Bays AM, Gardner G. Pharmacologic therapies for rheumatologic and autoimmune conditions. *Med Clin North Am* (2016) 100(4):719–31. doi:10.1016/j.mcna.2016.03.001
126. Katabathina V, Menias CO, Pickhardt P, Lubner M, Prasad SR. Complication of immunosuppressive therapy in solid organ transplantation. *Radiol Clin North Am* (2016) 54(2):303–19. doi:10.1016/j.rcl.2015.09.009
127. Popov I, Li M, Zheng X, San H, Zhang X, Ichim TE, et al. Preventing autoimmune arthritis using antigen-specific immature dendritic cells: a novel tolerogenic vaccine. *Arthritis Res Ther* (2006) 8(5):R141. doi:10.1186/ar2031
128. van Duivenvoorde LM, Han WG, Bakker AM, Louis-Pence P, Charbonnier LM, Apparailly F, et al. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol* (2007) 179(3):1506–15. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1506
129. Phillips BE, Giannoukakis N, Trucco M. Dendritic cell mediated therapy for immunoregulation of type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Rev* (2008) 5(4):873–9.
130. Tai N, Yasuda H, Xiang Y, Zhang L, Rodriguez-Pinto D, Yokono K, et al. IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice. *Clin Immunol* (2011) 139(3):336–49. doi:10.1016/j.clim.2011.03.003

131. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Pozo D, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(38):13562–7. doi:10.1073/pnas.0504484102
132. Horibe EK, Sacks J, Unadkat J, Raimondi G, Wang Z, Ikeguchi R, et al. Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion. *Transpl Immunol* (2008) 18(4):307–18. doi:10.1016/j.trim.2007.10.007
133. Raimondi G, Sumpter TL, Matta BM, Pillai M, Corbitt N, Vodovotz Y, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition and alloantigen-specific regulatory T cells synergize to promote long-term graft survival in immunocompetent recipients. *J Immunol* (2010) 184(2):624–36. doi:10.4049/jimmunol.0900936
134. Phillips BE, Garciafigueroa Y, Trucco M, Giannoukakis N. Clinical tolerogenic dendritic cells: exploring therapeutic impact on human autoimmune disease. *Front Immunol* (2017) 8:1279. doi:10.3389/fimmu.2017.01279
135. Lord P, Spiering R, Aquillon JC, Anderson AE, Appel S, Benitez-Ribas D, et al. Minimum information about tolerogenic antigen-presenting cells (MITAP): a first step towards reproducibility and standardization of cellular therapies. *PeerJ* (2016) 4:e2300. doi:10.7717/peerj.2300
136. Ten Brinke A, Hilkens CM, Cools N, Geissler EK, Hutchinson JA, Lombardi G, et al. Clinical use of tolerogenic dendritic cells-harmonization approach in European collaborative effort. *Mediators Inflamm* (2015) 2015:471719. doi:10.1155/2015/471719
137. Palucka K, Bancheray J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* (2012) 12(4):265–77. doi:10.1038/nrc3258
138. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* (2011) 34(9):2026–32. doi:10.2337/dc11-0472
139. Benham H, Nel HJ, Law SC, Mehdi AM, Street S, Ramnorothe N, et al. Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med* (2015) 7(290):290ra87. doi:10.1126/scitranslmed.aaa9301
140. Jauregui-Amezaga A, Cabezon R, Ramirez-Morros A, España C, Rimola J, Bru C, et al. Intraoperative administration of autologous tolerogenic dendritic cells for refractory Crohn's disease: a phase I study. *J Crohns Colitis* (2015) 9(12):1071–8. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv144
141. Voigtländer C, Rössner S, Cierpka E, Theiner G, Wiethe C, Menges M, et al. Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and after subcutaneous injection in vivo which converts their tolerogenicity into immunogenicity. *J Immunother* (2006) 29(4):407–15. doi:10.1097/01.cji.0000210081.60178.b4
142. Lim DS, Kang MS, Jeong JA, Bae YS. Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic then inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice. *Eur J Immunol* (2009) 39(5):1334–43. doi:10.1002/eji.200838987
143. Thewissen K, Broux B, Hendriks JJ, Vanhees M, Stinssen P, Slaets H, et al. Tolerogenic dendritic cells generated by in vitro treatment with SAHA are not stable in vivo. *Cell Transplant* (2016) 25(6):1207–18. doi:10.3727/096368915X690305
144. Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* (2007) 178(11):7018–31. doi:10.4049/jimmunol.178.11.7018
145. Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* (2005) 62(1):45–54. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01640.x
146. Horton C, Shanmugarajah K, Fairchild PJ. Harnessing the properties of dendritic cells in the pursuit of immunological tolerance. *Biomed J* (2017) 40(2):80–93. doi:10.1016/j.bj.2017.01.002
147. Kajino K, Nakamura I, Bamba H, Sawai T, Ogasawara K. Involvement of IL-10 in exhaustion of myeloid dendritic cells and rescue by CD40 stimulation. *Immunology* (2007) 120(1):28–37. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02474.x
148. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol* (2014) 5:7. doi:10.3389/fimmu.2014.00007
149. Dhodapkar MV, Sznol M, Zhao B, Wang D, Carvajal RD, Keohan ML, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* (2014) 6(232):232ra51. doi:10.1126/scitranslmed.3008068
150. Dominguez AL, Lustgarten J. Targeting the tumor microenvironment with anti-neu/anti-CD40 conjugated nanoparticles for the induction of antitumor immune responses. *Vaccine* (2010) 28(5):1383–90. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.153
151. Cruz LJ, Rosalia RA, Kleinovink JW, Rueda F, Löwik CW, Ossendorp F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. *J Control Release* (2014) 192:209–18. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.040
152. Schinnerling K, García-González P, Aguilón JC. Gene expression profiling of human monocyte-derived dendritic cells—searching for molecular regulators of tolerogenicity. *Front Immunol* (2015) 6:528. doi:10.3389/fimmu.2015.00528
153. García-González PA, Schinnerling K, Sepúlveda-Gutiérrez A, Maggi J, Mehdi AM, Nel HJ, et al. Dexamethasone and monophosphoryl lipid A induce a distinctive profile on monocyte-derived dendritic cells through transcriptional modulation of genes associated with essential processes of the immune response. *Front Immunol* (2017) 8:1350. doi:10.3389/fimmu.2017.01350
154. Dáňová K, Grohová A, Strnadová P, Funda DP, Sumník Z, Lebl J, et al. Tolerogenic dendritic cells from poorly compensated type 1 diabetes patients have decreased ability to induce stable antigen-specific T cell hyporesponsiveness and generation of suppressive regulatory T cells. *J Immunol* (2017) 198(2):729–40. doi:10.4049/jimmunol.1600676
155. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, de Creus A, et al. "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol* (2006) 177(9):5868–77. doi:10.4049/jimmunol.177.9.5868
156. Lee JH, Park CS, Jang S, Kim JW, Kim SH, Song S, et al. Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci Rep* (2017) 7(1):15087. doi:10.1038/s41598-017-15569-1
157. Sachamitr P, Leishman AJ, Davies TJ, Fairchild PJ. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into dendritic cells displaying tolerogenic properties and resembling the CD141+ subset. *Front Immunol* (2018) 8:1935. doi:10.3389/fimmu.2017.01935

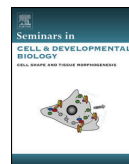
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Serrano, Luque and Aran. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Review

Complement components as promoters of immunological tolerance in dendritic cells

Ana Luque¹, Inmaculada Serrano¹, Josep M. Aran*

Immune-Inflammatory Processes and Gene Therapeutics Group, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2017
 Received in revised form
 14 November 2017
 Accepted 15 November 2017
 Available online 21 November 2017

Keywords:

Complement
 Dendritic cells
 Immunomodulation

ABSTRACT

Complement and dendritic cells (DCs) share many functional features that drive the outcome of immune-inflammatory processes. Both have a sentinel function, acting as danger sensors specialized for a rapid, comprehensive and selective action against potential threats without damaging the healthy host cells. But while complement has been considered as a “master alarm” system poised for direct pathogen killing, DCs are regarded as “master regulators” or orchestrators of a vast range of effector immune cells for an effective immune response against threatening insults. The original definition of the complement system, coined to denote its auxiliary function to enhance or assist in the role of antibodies or phagocytes to clear microbes or damaged cells, envisaged an important crosstalk between the complement and the mononuclear phagocyte systems. More recent studies have shown that, depending on the microenvironmental conditions, several complement effectors are competent to influence the differentiation and/or function of different DC subsets toward immunogenicity or tolerance. In this review we will infer about the capability of complement activators and inhibitors to “condition” a tolerogenic and anti-inflammatory immune response by direct interaction with DC surface receptors, and about the implications of this knowledge to devise new complement-based therapeutic approaches for autoimmune pathologies.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	143
2. DCs ontogeny and subsets	144
3. Functional plasticity of DCs: immunogenicity and tolerance	144
4. Complement in DC function	145
5. Immunomodulatory actions of complement over DCs	145
5.1. Complement effectors	145
5.1.1. Complement pattern recognition molecules	145
5.1.2. Complement components, cleavage products and their receptors	146
5.2. Complement inhibitors	148
6. Therapeutic implications for autoimmunity	148
7. Concluding remarks and perspectives	149
Acknowledgments	149
References	150

1. Introduction

Bridging innate and adaptive immunity within the mammalian immune system, dendritic cells (DCs) are endowed with unique properties to sense the environment for external signals, process them and crosstalk with other immune cells (such as the core adaptive T and B lymphocytes) inducing a variety of acquired immune responses to adequately tackle with homeostasis, pathology or

* Corresponding author at: Immune-Inflammatory Processes and Gene Therapeutics Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals, Gran Via de L'Hospitalet, 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

E-mail address: jaran@idibell.cat (J.M. Aran).

¹ Equal contribution.

infection [1]. Moreover, DCs possess both innate and acquired “plasticity”. Thus, according to their ontogeny they can be divided in different subsets with specific properties and mechanisms of action. Furthermore, DCs confront input challenges through a rich variety of surface or intracellular receptors able to distinguish “non-self” (e.g., pattern recognition molecules such as toll-like receptors (TLRs), scavenger receptors) and “self” (e.g., major histocompatibility complex (MHC) molecules, co-stimulatory molecules). Adding an extra layer of complexity, several receptors may be able to cluster depending on the antigen or stimulus perceived, forming “immunological synapses”, to fine-tune the modulation of the downstream immune response [2]. Finally, they are able to modify their morphology and biochemical behavior (e.g., the pattern of secreted cytokines and chemokines, metabolites...) and adapt themselves to novel or changing environmental conditions, prompting a positive (immunogenic DCs) or a negative (tolerogenic DCs (toDCs)) immune response. All these interesting features allow DCs to orchestrate the most effective response in each situation, becoming a fundamental “master regulator” of the host immune system. In fact, constitutive ablation of DCs in mice leads to lethal systemic autoimmunity [3].

An essential component of the necessary crosstalk between innate and adaptive immunity that has been frequently overlooked involves the interaction between DCs and the complement system. With over 50 plasma and membrane-associated serum proteins integrating the complement cascade, this ancient, evolutionary conserved humoral arm of the innate immunity has been poised not only to recognize and fight pathogens but also, according to more recent studies, to influence a variety of homeostatic (e.g., hemostasis, apoptosis) and pathological (e.g., cancer, autoimmune disorders) processes in vascularized organisms [4]. According to the classical conception of the complement system halting the invasion of foreign intruders by opsonization or direct killing of the challenging pathogen, most protective actions initiated by complement activation are pro-inflammatory and, in turn, induce an activation of the adaptive immune system at several levels. Nevertheless, in the last years it has become evident that, under certain conditions, several components of the complement system, either directly or indirectly are also able to induce a “negative” or tolerogenic immune response upon interaction with DCs. In this review we aim to overview the current knowledge regarding the direct immunomodulatory involvement of complement system components in the transformation of DCs toward a tolerogenic state, and the practical implications of this aspect for the treatment of dysfunctions with over-activation of the immune-inflammatory axis, such as autoimmune processes.

2. DCs ontogeny and subsets

DCs are a heterogeneous group of myeloid cells with distinct phenotypic and functional properties. DC subset classification is being refined and redefined as the new advances in hematopoiesis, immunology and novel exploration methodologies (polychromatic flow cytometry, -omics profiling, single-cell analyses) are being achieved. The criteria being currently employed is based in their localization, phenotype, ontogeny, expression profile and specialized function, although the lines separating the different DC subsets are blurry [5,6]. In general, DCs belong to the mononuclear phagocyte system (MPS), together with monocytes and macrophages. Thus, according to their hematopoietic stem cell origin, steady-state DCs derive from a common bone marrow DC precursor (CDP), and in the peripheral organs have developed typically into: 1) “classical” or “conventional” type 1 (cDC1, or human CD141 (blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)⁺ DCs) and type2 (cDC2, or human CD1c (BDCA1)⁺ DCs), that regulate mainly, but not exclusively,

Th1-type and Th2-type immune responses, respectively, and 2) plasmacytoid DCs (pDCs), whose main differential functional trait is the overproduction of type I IFN upon viral infection.

A special consideration deserve traditional monocyte-derived DCs (Mo-DCs). These are, by far, the most studied DCs due to their ease of acquisition in high numbers through *in vitro* differentiation (using GM-CSF (CSF2) + IL-4) from CD14⁺ peripheral blood monocytes [7]. Monocytes and monocyte-derived cells arise *in vivo* from common monocyte progenitors (cMoPs). Under inflammatory conditions, “classical” monocytes (CD14⁺CD16⁻, being the mouse counterpart Ly6C^{high}) seem to acquire extra flexibility when trafficking and rapidly accumulating to the inflamed tissues, and can locally transform to monocyte-derived macrophages (primed through M-CSF (CSF1)) or to Mo-DCs (primed through GM-CSF, and termed “inflammatory DCs”, with phenotype CD14⁺CD1c⁺CD1a⁺), exhibiting both shared and differential functional properties depending on specific microenvironmental cues, although it is still unclear whether they might constitute ontogenically distinct lineages. To note, transcriptomic analysis has shown that *in vitro*-generated Mo-DCs from CD14⁺-monocytes and inflammatory DCs isolated from human inflammatory fluids share gene signatures, suggesting that human inflammatory DCs are the *in vivo* counterpart of Mo-DCs [8], similar to murine inflammatory DCs and murine bone marrow DCs (BM-DCs) [9].

3. Functional plasticity of DCs: immunogenicity and tolerance

DCs are endowed with high plasticity to effectively adapt and respond to a variety of environmental stimuli, being able to reach diametrically-opposed functions. Thus, in contrast to other phagocytes, such as macrophages and neutrophils, DCs are particularly devoted and specialized to sense and contact potential harmful “non-self” or “modified-self” substances throughout the body, uptake them *in situ* and process them while traveling from peripheral tissues to draining lymph nodes, experiencing profound biochemical and morphological transformations leading to their “maturation” or activation. Interestingly, it has been recently shown that plasmacytoid, conventional and Mo-DCs undergo a convergent genetic reprogramming during their maturation, leading to similar phenotypes [10].

A number of pro-inflammatory or immunogenic mediators: TLR agonists (LPS, imiquimod), cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12, IL-15), co-stimulatory ligands (CD40L), chemical (cyclophosphamide) or biological compounds (prostaglandin E2 (PGE₂), palmitic acid) have been found to provoke Mo-DC maturation *in vitro*, leading to “immunogenic” DCs, characterized by increased levels of MHC II and co-stimulatory molecules, by reduced antigen capture and enhanced antigen presentation and priming of naïve T cell responses, and by increased secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6...).

On the other hand, in steady-state healthy tissues, both lymphoid-resident and, particularly, lymphatic system-migrating DCs are in an “alert” immature state (displaying highly efficient antigen uptake, processing and presentation, but low expression of co-stimulatory molecules), whereby induction of antigen-specific FoxP3⁺ regulatory T cell (Treg) populations and peripheral tolerance to self-antigens ensues [11]. Moreover, the pattern of secreted cytokines shifts towards an anti-inflammatory mode (IL-10, TGF- β). Analogously, the uptake of apoptotic, but not necrotic, cells by immature DCs renders them tolerant, resistant to maturation, and induce FoxP3⁺ Treg cells via TGF- β secretion [12]. Besides the generation of Treg cells, other, not mutually exclusive, functional outcomes of toDCs in absence of maturation stimuli are: 1) T cell deletion, to maintain immunological homeostasis and actively

eliminate potentially autoreactive T cells from both the thymus and peripheral tissues by apoptosis, through activation of death pathways such as Fas-FasL [13] and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-TRAIL receptors [14], or through indoleamine dioxygenase (IDO) overexpression and tryptophan catabolism [15], and 2) T cell anergy, in absence of co-stimulation (e.g., by B7:CD28 co-stimulatory signal blockade through binding of cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) on activated T cells [16]). TolDCs are also able to induce regulatory B cells [17,18]. Yet another type of tolerogenic DC precursor is an integral constituent of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) [19]. These cells can inhibit T cell responses by antigen-specific mechanisms, have been identified in cancer and infection, and are currently targets for therapeutic intervention.

A variety of agents such as hormones (vitamin D₃), neuropeptides such as vasoactive intestinal peptide (VIP), immunosuppressants (corticosteroids, rapamycin, cyclosporine, tacrolimus), cytokines and growth factors (IL-10, TGF-β, HGF) or other drugs (aspirin, retinoic acid) have been reported to induce *in vitro* a “semi-mature” state in Mo-DCs, displaying most, if not all, of the following phenotypic traits: low MHC II and costimulatory molecule expression, increased expression of surface immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) containing receptors (Fc gamma receptor IIb (CD32b), Ig-like inhibitory receptors (ILT3/ILT4), and paired immunoglobulin-like receptor (PILR)), and enhanced levels of heme oxygenase 1, human leukocyte antigen G (HLA-G), FasL (CD95L), galectin 1, IDO, IL-10, TGF-β, TNF-α-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin (DC-SIGN) and/or programmed death-ligand 1 (PD-L1) [20]. These “permissive”, “tolerogenic”, “regulatory”, “alternatively activated”, or “maturation-resistant” DCs usually show an anti-inflammatory profile and are capable to downregulate adaptive responses through, in most cases, the prevention of T helper cell polarization and the generation of Tregs.

In summary, the diverse functions of DCs are determined both by their ontogeny and by their state of maturation or activation, which can be modulated by a variety mediators including exogenous and endogenous factors [21]. Therefore, DCs are attractive targets for therapeutic intervention at multiple levels.

4. Complement in DC function

The intricate molecular mechanisms of complement activation are well known, and have been refined in the last years by biophysical studies leading to structural determinations of several of its main components. A variety of excellent reviews have been published recently about the subject [22–24], just to name a few. To summarize, the complement system can be activated *in situ* through three different pathways according to the type of insult encountered (mainly pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), but also damage-associated molecular patterns (DAMPs)): 1) the *classical pathway*, activated preferentially by binding of C1q (the initial protein in the cascade) to antigen-antibody complexes; 2) the *lectin pathway*, activated by mannose-binding lectin (MBL), ficolins, and/or collectin-11 binding mainly to microbial carbohydrates and 3) the *alternative pathway*, initiated by a failure to regulate the spontaneous hydrolysis of C3 convertase over pathogen surfaces. All of them converge, through a series of sequential cleavages by serine proteases, in the formation of homologous variants of the protease C3 convertase, cleaving and activating component C3 into C3a and C3b, and further inducing a sequence of coordinated cleavage and activation steps leading to enzymatic signal self-amplification and, finally, preceding the terminal stage of the membrane attack complex (MAC) formation (involving C5b to

C9), which holds the cytolytic activity over non-nucleated cells (e.g., bacteria and red blood cells). In each step of this enzymatic cascade, most of the complement components (C1 to C5), the resulting products: opsonins (C3b/iC3b, C4b), anaphylotoxins (C3a, C5a) or other factors (Factor B, Factor D, Factor P), besides their known role as complement effector molecules, hold additional roles by directly acting over immune cells and affecting immune surveillance. Hence, complement deficiencies (comprising between 1 and 10% of all primary immunodeficiencies) course with recurrent mild or severe infections [25].

Local production and activation of complement has deemed important for DC functional development [26–28]. In fact, human monocyte-derived (CD1a⁺CD14⁻), dermal (CD1a⁺DC-SIGN⁺), Langerhans (CD1a⁺Langerin⁺), myeloid (CD1c⁺CD19⁻), and plasmacytoid (CD45RA⁺CD123⁺) DCs readily express most if not all, with slight variations depending on the DC subset, complement components, receptors and regulators [29–31]. Moreover, several complement components such as C1q and C7 are mainly produced outside the liver [32,33]. Thus, in addition to the classical paracrine modulation by hepatic complement components, DCs can also experience microenvironmental paracrine modulation, or autocrine modulation from their own secreted “extrahepatic” complement.

5. Immunomodulatory actions of complement over DCs

The complement system also holds relevant anti-inflammatory functions, albeit acting indirectly, facilitating the removal of immune complexes from the circulation and apoptotic cells from damaged tissues, in close interplay with DCs [34]. Particularly, the complement-phagocyte crosstalk seems to play a key role for dead cell clearance in a non-immunogenic “silent” mode and, consequently, in balancing inflammation when facing DAMPs. Furthermore, in recent years it has become clear that other “non-canonical” activities of a variety of complement components, both complement effectors and complement modulators, acting directly over DCs are able to induce a tolerogenic phenotype on these cells (Fig. 1 and Table 1), although the precise molecular mechanisms of DC immunomodulation are still unknown for most of these complement proteins.

5.1. Complement effectors

5.1.1. Complement pattern recognition molecules

In addition to their central role as complement cascade initiators for microbial phagocytosis and killing, it is becoming evident that both C1q and mannose-binding lectin (MBL) are able to promote an immunomodulatory and anti-inflammatory environment by direct interaction with DCs and other immune cells. Structurally, C1q, a major component of the C1 complex, is a two heterotrimeric collagen-like stalk assembly from three polypeptide chains each containing an N-terminal collagen-like sequence (cC1q) and a C-terminal globular domain (gC1q). C1q functions as a molecular scaffold for the serine protease complex C1r₂C1s₂, which is activated upon C1q binding to its ligands. Immature DCs express C1q, although its production seems to be abrogated upon DC maturation [35]. C1q has been directly involved in the opsonization of blebs and apoptotic cells for phagocytosis by binding the acidic Ca²⁺-binding protein calreticulin. This “eat me” intermediate interacts with CD91 on the phagocytes and initiates the efferocytosis process [36]. A recent study has shown that Mo-DCs ingesting autologous, C1q-bound, late apoptotic lymphocytes (LAL) display higher surface PD-L2 and reduced CD86, and decreased autologous Th17 and Th1 proliferation in a mixed lymphocyte reaction relative to Mo-DCs ingesting LAL alone [37]. C1q has also suggested to play

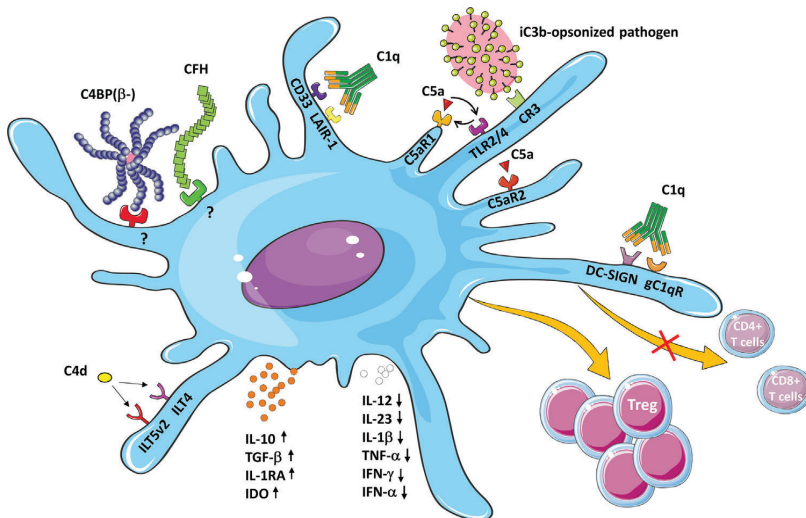


Fig. 1. Complement effectors are able to induce a tolerogenic phenotype in DCs. Pattern recognition molecules such as C1q, which signals through gC1qR cognate receptor clustering with other effector receptors such as DC-SIGN [44], or through CD33 plus LAIR-1 inhibitory immunoreceptors [48], up-regulate the PI3K-AKT immunomodulatory pathway. Among complement split products, opsonins can bind to complement receptors (e.g., iC3b-CR3 [56,67], or C3b/iC3b-CR1g [69]). C4d can also signal through the scavenger-type inhibitory receptors ILT5v2 or ILT-4 [73]. Anaphylotoxins such as C5a may be able to prevent immunogenic DC activation by interfering with TLR signaling through C5a-C5aR1 crosslinking [59,60], or by interacting with the alternative C5aR2 (C5L2) receptor [64]. Furthermore, soluble complement inhibitors such as C4BP(β -) and CFH interact with, as yet, unknown immunomodulatory receptors on the DC surface [80,84]. The outcome of all these context-dependent signals affect DC differentiation and/or function, and induce a semi-mature, tolerogenic and anti-inflammatory phenotype to DCs, typically characterized by low co-stimulatory molecule (CD40, CD86, B7-H1, B7-DC) expression, reduced production of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-23, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IFN- α) and, conversely, increased secretion of anti-inflammatory mediators (IL-10, TGF- β , IL-1RA, IDO), blockade of Th1 polarization and/or induction of Tregs.

a protective role, enhancing phagocyte survival and efferocytosis, in atherosclerotic lesions [38]. Moreover, C1q directly inhibits the production of inflammatory cytokines. Upon peritoneal LPS challenge, C1q^{-/-} mice produced higher levels of IL-12p40 than wild type mice [39]. Immobilized C1q inhibited the synthesis of pro-inflammatory cytokines and, in contrast, increased the production of anti-inflammatory mediators such as IL-10 and IL-1 receptor antagonist [40,41]. On the other hand, cross-linking of the C1q receptor gC1qR on macrophages and DCs was able to activate the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway and negatively regulate IL-12p70 production [42]. Because both C1q receptors, gC1qR and cC1qR, lack a transmembrane domain for intracellular communication, signaling seems to occur through a growing list of co-receptors including CD91, CD44, β 1-integrins and, more recently, DC-SIGN [43]. In fact, it has been suggested that signaling through a trimolecular receptor complex between C1q, gC1qR and DC-SIGN could regulate DC differentiation and function [44]. Moreover, in pDCs, C1q inhibits immune complex-induced IFN- α production [45], and has proved a potent inhibitor of allergic asthma without induction of Treg cells [46]. Another non-complement mechanism of C1q-mediated immunomodulation involves high-affinity binding between C1q and the inhibitory immunoreceptor leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor (LAIR-1), which inhibits monocyte-to-DC differentiation and pDC activation [47], and through C1q-CD33/LAIR-1 crosslinking [48]. Thus, C1q-mediated immunomodulation is exerted through both enhanced phagocytosis and reduced immune-inflammatory responses.

As suggested above, the regulatory effects of C1q on monocyte/DC precursors could be mediated by gC1qR, occurring within a narrow timeframe of monocyte to DC transition and being influenced by the microenvironment. Thus, in the presence of danger signals, C1q would recognize and bind antigens through its globular head domains leading to activation of a pro-inflammatory immune

response. Conversely, in the absence of danger signals, C1q would maintain immature DCs in a tolerance state through gC1qR [49].

MBL, the prototypic initiator of the lectin pathway of complement activation, belongs to the collectin family and, through its carbohydrate-recognition domains, is able to bind to oligosaccharides (mannose, N-acetyl-glucosamine) on the pathogen surface. Like C1q deficiency, MBL deficiency has been associated with bacterial, viral and fungal infections in humans [50]. Thus, cDCs from MBL-deficient individuals showed increased IL-6 production, a feature of pathogen-stimulated cDCs, which could be reversed by *in vitro* addition of MBL [51]. In fact, MBL seems to affect the phenotype and function of DCs by attenuating lipopolysaccharide (LPS) binding to immature DCs and their further maturation and pro-inflammatory cytokine production (IL-12, TNF- α), while preventing allogeneic T lymphocyte proliferation [52]. Moreover, it has been recently shown that MBL is also able to bind dsRNA and suppress TLR3 activation and pro-inflammatory cytokine production [53], suggesting that it might hold anti-inflammatory properties during anti-viral immunity.

5.1.2. Complement components, cleavage products and their receptors

The main effector molecules of unprocessed complement components (C1 to C5) are opsonins and anaphylotoxins. One of the most well-known interactions of complement components (e.g., C3b and its factor I-cleaved fragments iC3b, C3c, and C3dg) with phagocytes occurs when acting as opsonins, decorating pathogens and enhancing their clearance from surface-expressed complement receptors in DCs, macrophages and Kupffer cells (CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18), or the complement receptor of the immunoglobulin superfamily, CR1g). While in the context of complement activation in the fight against pathogens these molecules have an immunogenic and pro-inflammatory role, more recent studies are evidencing just the opposite, which is

Table 1
Direct immunomodulation of DCs by complement effectors.

Complement Effector	DC subset	Species	Interacting receptor(s)/co-receptors	Immunomodulatory features	References
Pattern recognition Molecules					
C1q	Phagocytes, Mo-DCs, BM-DCs, pDCs	Human, Mouse	cC1qR (calreticulin), CD91 gC1qR, DC-SIGN LAIR-1, CD33	PD-L2 \uparrow , CD86 \downarrow IL-10 \uparrow , IL-12 \downarrow , IL-23 \downarrow , IFN- α \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , TNF- α \downarrow Th17 and Th1 proliferation \downarrow , Efferocytosis \uparrow	[36,37,39–42,44,45,47,48]
MBL	cDCs, Mo-DCs	Human	CR1, TLR3	IL-6 \downarrow , IL-12 \downarrow , TNF- α \downarrow , IFN- β \downarrow Allogeneic T lymphocyte proliferation \downarrow	[51–53]
Components					
C3	pDCs	Mouse	?	IFN- α \downarrow	[57]
C4	cDCs	Human	CR1	TGF- β \uparrow Treg generation \uparrow	[72]
Cleavage products					
iC3b	Mo-DCs, BM-DCs, Peritoneal exudate cells (PECs)	Human, Mouse, Rat	CR3	CD11c \downarrow , CD11b \uparrow , CD40 \downarrow , CD86 \downarrow , CD1a \downarrow , MHCII \downarrow IL-12 \downarrow , IL-10 \uparrow , TGF- β \uparrow Allogeneic T lymphocyte proliferation \downarrow	[55,56,66]
C5a	Mo-DCs, cDCs, Pulmonary pDCs	Human, Mouse	C5aR1, C5aR2	B7-H1 \uparrow , B7-DC \uparrow IL-12 \downarrow , IL-23 \downarrow , TNF- α \downarrow , Th2 cytokines (IL-5, IL-13) \downarrow , IL-23 \downarrow , IL-17A \downarrow , IFN- γ \downarrow T _H 17 cells \downarrow	[59–61,63,64]
Complement inhibitors					
C4BP(β-)	Mo-DCs	Human	Unknown	CD83 \downarrow , CD80 \downarrow , CD86 \downarrow IL-12 \downarrow , TNF- α \downarrow , IFN- γ \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , IL-10 \uparrow , TGF- β \uparrow Th1 proliferation \downarrow , Treg generation \uparrow	[80]
CFH	Mo-DCs	Human	Unknown	CD83 \downarrow , CD80 \downarrow , CD86 \downarrow IL-12 \downarrow , TNF- α \downarrow , IFN- γ \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , IL-10 \uparrow , TGF- β \uparrow Th1 proliferation \downarrow , Treg generation \uparrow	[84]

immunomodulatory and anti-inflammatory tasks in homeostatic processes, particularly in apoptotic cell clearance. Besides C1q (examined in section 5.1.1.), another member of the C1 complex, the protease C1s, has been shown to additionally cleave intracellular proteins exposed by apoptotic cells such as the nuclear alarmin high mobility group box 1 (HMGB1), abrogating its ability to cooperate with LPS in inducing pro-inflammatory cytokine production and phagocyte activation [54]. C3 has proved relevant in the differentiation process of MDSCs, although this suppressive activity seems to be due to its activation product iC3b, but not to C3d [55]. Likewise, the opsonin iC3b induces tolerance in DCs by binding to CR3 and stimulating the production TGF- β and IL-10 [56]. A recent study has also identified an unsuspected role for C3 regulating IFN- α production by pDCs following TLR7 activation [57].

The most relevant C3 and C5 cleavage fragments include anaphylotoxins C3a and C5a as well as opsonins C3b/iC3b/C3dg and C4b. All these mediators may hold context-dependent immunomodulatory activities acting over immune cells at several levels. C3a and C5a interact with their cognate receptors (C3aR, and C5aR1 and C5aR2, respectively) in phagocytes. Thus, although both C3a and C5a enhance cell activation, allostimulatory capacity and pro-inflammatory cytokine production in DCs [58], it has been shown that crosstalk between toll like receptors and C5a induce the opposite, that is, inhibits production of IL-12, IL-23 and TNF- α in Mo-DCs, while production of IL-10 is not affected [59]. Indeed, examination of C5a/C5aR-LPS/TLR4 crosstalk in Mo-DCs by RNA sequencing has uncovered a central immune regulatory net-

work involving transcription the factors forkhead box protein O1 (FOXO1) and O3 (FOXO3) and the signaling molecules glycogen synthase kinase 1 (GSK1), ribosomal S6 kinase 2 (RSK2), and PI3K β , the overall outcome of which being anti-inflammatory [60]. Moreover, several reports have shown that C5a/C5aR1 signaling during allergen sensitization is able to maintain tolerance mediated by DCs. For example, a protective role of the C5a/C5aR1 axis in the development of allergic asthma has been associated with decreased levels of costimulatory molecules B7-H1 (PD-L1) and B7-DC (PD-L2) on pDCs [61], increased production of Th2 attracting chemokines CCL17 and CCL22 [62], and suppressed development of Th17 cells through inhibition of IL-23 production from DCs [63]. On the other hand, in a model of house dust mite-induced allergic asthma, engagement of C5aR2 led to suppression of Th1 and Th17 differentiation in myeloid DCs [64]. Nevertheless, the pathophysiological function of C5aR2 is still controversial [65].

The major function of opsonins (C3b/iC3b/C3dg, C4b) is to label microbes and host debris for clearance, including apoptotic cells, and context-dependent discrimination of foreign danger or homeostatic signals by the corresponding phagocyte receptors (CR1-4, CRIg) will likely drive the functional outcome of these cells towards an immunogenic or a tolerogenic state. Thus, iC3b/CR3 interaction has been shown to inhibit Mo-DC differentiation, IL-12 production and allogeneic CD4⁺ T cell proliferation through mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling [66]. Moreover, both iC3b/CR3 and iC3b/CR4 seem to be involved in podosome formation, necessary for cellular motility [67]. C3b/iC3b can also interact with the CRIg

type I transmembrane receptor, a new player in the modulation of immunity to infection and inflammation expressed on monocytes, macrophages and DCs. Indeed, human DCs expressing CR1g have been involved in T cell immunosuppression [68,69]. C4 appears to have an important role in several aspects of the immune system. C4 deficiency constitutes a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility, and SLE patients show low serum C4 concentrations [70]. Moreover, C4 knockout mice had a low frequency of Treg cells [71]. Concordantly, it has been recently shown that C4 skews T cells differentiation towards Treg cells through DCs [72], although the precise immunomodulatory mechanism at the molecular level, and the responsible C4 domain or split product were not assessed. Soluble monomeric C4d, a cleavage product of C4b, has also been shown to possess immunomodulatory properties on phagocytes through interaction with the scavenger-type inhibitory receptors Ig-like transcript 4 (ILT4) and Ig-like transcript 5 variant 2 (ILT5v2) [73].

5.2. Complement inhibitors

Over-activation of the complement system other than in pathogen surfaces can lead to collateral healthy cell damage having catastrophic consequences in the host tissues. Thus, host cells have devised a variety of protective mechanisms targeting key points in the complement cascade to prevent unintended spatial and/or temporal activation of the complement system on intact self-surfaces, which could lead to autoimmunity. Thus, a diversity of complement regulatory proteins both surface-associated: CD35 (CR1), CD46 (membrane cofactor protein (MCP)), CD55 (decay-accelerating factor (DAF)) and CD59 (protectin), or soluble: Factor I, C1-inhibitor, C4b-binding protein (C4BP), Factor H (CFH), have been shown to fulfill this purpose [74]. It follows that if complement inhibitors act as brakes for complement over-activation, they might also sustain DC modulation in an eventual direct interaction with these cells.

Most membrane-associated (CD35, CD46, CD55) and several soluble complement inhibitors (C4BP, CFH) belong to the superfamily of regulators of complement activation (RCA). These modular proteins are typically constituted by 60 amino acid residues termed “complement control proteins” (CCP), “short consensus repeats” (SCR), or “Sushi domains”, arranged in a beta-sandwich conformation containing two conserved disulfide bonds and a conserved tryptophan. Within a protein, these modules are able to cooperate conferring flexibility and stability, and to arrange shaping specific binding surfaces [75]. CD55 is a cell surface complement regulator that dissociates C3/C5 convertases, preventing the generation of C3a/C5a. Bone marrow-derived DCs from *Daf1* transgenic mice produced less anaphylotoxins during antigen-presenting cell:T cell engagement and reduced T cell responses *in vitro* [76].

The main soluble complement inhibitors, the glycoproteins C4BP and CFH, exert a tight regulation of the classical/lectin and alternative pathways of complement activation, respectively, attenuating the activity of C3/C5 convertases. The major C4BP isoform, C4BP $\alpha7\beta1$ or C4BP($\beta+$), has a heterooligomeric spider-like structure (570 kDa) integrated by seven identical 70 kDa α -chains and a single 40 kDa β -chain joined in their C-termini forming a core oligomerization module stabilized by intermolecular disulfide bonds. The α -chain is composed of 8 CCP domains while the β -chain is composed of 3 CCP domains, both arranged in tandem [77]. The CCP1 to CCP3 N-terminal domains of the α -chains, responsible for the complement inhibitory activity, bind C3b, C4b, heparin, pentraxins, CD91, DNA, and are also the major domains for pathogen binding and evasion from complement action. The β -chain has a high-affinity binding and inactivation site for anti-coagulant vitamin K-dependent Protein S (ProS), which allows a strong interaction with apoptotic/necrotic cells to prevent inflam-

mation [78]. The minor C4BP isoform, C4BP $\alpha7\beta0$ or C4BP($\beta-$), holds the same oligomeric structure than C4BP($\beta+$) but lacks the β -chain and, therefore, is unable to bind ProS, although it retains the same complement inhibitory activity than the major C4BP isoform. In the circulation and under homeostatic conditions the ratio of both isoforms (C4BP($\beta+$)-ProS complex to C4BP($\beta-$)) is about 80:20 but, remarkably, under acute phase conditions this C4BP isoform ratio can shift to nearly 50:50 as a consequence of the differential regulation of the α - and β -chains by pro-inflammatory cytokines [79]. We have reported that the C4BP($\beta-$) isoform, but not the C4BP($\beta+$) isoform, is able to directly interact with Mo-DCs and to confer an anti-inflammatory, tolerogenic phenotype to these cells, characterized by low surface expression of CD83, CD80, and CD86, inhibition of pro-inflammatory IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 production and, instead, increased expression of anti-inflammatory IL-10 and TGF- β , reduced CCR7 expression and chemotaxis, prevention of allogeneic T cell proliferation and promotion of Tregs [80]. Alternatively, C4BP has been recently shown to bind cell-surface TLRs and, thereby, has been proposed as a negative regulator of TLR activity [81].

CFH belongs to a protein family that includes CFHL1 and five Factor H-related (CFHR) proteins. CFH is a lineal, single-chain polypeptide (155 kDa) composed by 20 CCP domains. It is the most efficient inhibitor of the alternative pathway through its C3bBb decay accelerating and FI-cofactor regulatory activities localized in the N-terminal CCP1 to CCP4 domains. Moreover, the C-terminal CCP19-CCP20 domain region is able to bind to cell surface C3d thioester-containing domain of iC3b/C3d as well as to cell surface anionic clusters (charged glycosaminoglycans (GAGs) or sialic acid in glycans) with high avidity for self-protection from complement attack [82]. Mutations of CFH, particularly in its CCP19 and/or CCP20 domains have been associated with a variety of autoimmune diseases such as atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), or membrano-proliferative glomerulonephritis type-2 (MPGN2-dense deposit disease (DDD)) [83]. Analogously to C4BP($\beta-$), we have recently shown that FH is able to induce a distinctive tolerogenic state in Mo-DCs acting in the early stages of monocyte to DC differentiation and characterized by phenotypic, morphological, and functional features equivalent to immature DCs [84]. Additionally, the C-terminal domains CCP19-CCP20 from the surface binding region appeared to be responsible for the tolerogenic activity of CFH. Concordantly, CFHL1, a splicing form of CFH encompassing their seven N-terminal domains, showed no tolerogenic activity over Mo-DCs [84]. Furthermore, neither CR3 nor CR4 seemed to be involved in this non-canonical immunomodulatory activity of CFH over Mo-DCs. Thus, ongoing studies will likely decipher the putative immunomodulatory receptor(s) and signaling pathways involved in CFH-conditioned DC transformation toward a tolerogenic state. Furthermore, given the significant sequence homology shared by the CCP19-CCP20 domains of CFH and the N-terminal CCP domains from the other CFHR family members, it seems foreseeable that these might also be able to modulate the functional outcome of DCs, either by themselves or by competing with CFH [85].

6. Therapeutic implications for autoimmunity

Given their central role at the crossroads between innate and adaptive immunity, both the complement system and DCs constitute interesting targets for therapeutic intervention. It has been long known that complement deregulation is one of pathogenic features of autoimmune diseases. Clinical evidence shows that deficiencies in classical pathway mediators (C1q, C1r, C1s, C4 and C2) can lead to the development of autoimmune disease [86]. Moreover, DCs, given their functional plasticity, play also essential roles,

both in the homeostatic maintenance of immunological tolerance or driving pathogenic autoimmunity, by directly influencing T and B cell behavior and contributing to the inflammatory environment [87]. Both animal models and *in vitro* studies have confirmed the central role of DCs in the pathogenesis of different autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, type 1 diabetes mellitus and SLE [88]. Conversely, ablation of DCs in mice caused spontaneous development of autoimmune pathology under steady-state conditions, confirming the essential role of DCs in the maintenance of immune tolerance and prevention of autoimmunity [3]. Thus, among the myriad of environmental signals that DCs are able to sense, DC crosstalk with complement effectors is emerging as a relevant alternative to intrinsically induce a regulatory phenotype able to suppress autoimmune responses in these cells.

The aetiopathogenesis of autoimmune diseases involve a complement hyperinflammatory phenotype, where the complement pathway overreacts to cellular damage and debris (apoptotic cells, immune complexes...) and, in turn, skews immune cells toward an immunogenic and pro-inflammatory state.

SLE is the paradigmatic autoimmune disease whose pathogenesis is closely related to complement dysregulation. Histological and immunohistochemical evidences have shown that immune complex deposits in the kidneys mediate excess complement activation and deposition of complement components [89]. It has also been widely demonstrated that both innate and adaptive immune cells contribute to SLE pathogenesis. DCs and monocytes from SLE patients have been shown to present phenotypic and functional abnormalities. Thus, DCs from SLE patients display increased expression of the co-stimulatory molecules CD40 and CD86, as well as a higher ratio of activating to inhibitory Fc gamma receptors (FcγRs) as compared to DCs from healthy controls [90]. These observations suggest that DC maturation may be involved in an inefficient peripheral tolerance in these patients. Indeed, interaction between T cells, B cells and DCs plays a central role in SLE pathogenesis, leading to loss of tolerance and aberrant polyclonal autoimmunity. C1q plays an important role in the clearance of IgG and IgM immune complexes in the circulation, and its deficiency predisposes to SLE [91], suggesting a role in the maintenance of tolerance. Accordingly, anti-C1q autoantibodies from SLE patients induce a pro-inflammatory phenotype in phagocytes [92]. Reduced expression of CR1, involved in clearing circulating immune complexes, and acquired deficiencies of CD55 and CD59 have also been detected in SLE patients [93]. C3aR-deficient *MRL/lpr* mice had elevated autoantibody titers, more glomerular crescents and more severe intra-renal vasculitis [94], which also reinforces a potential protective role of these complement effectors in SLE pathology, at least in particular circumstances. Finally, regarding complement inhibitors, CFH-deficient *MRL/lpr* mice had significantly more albuminuria, increased BUN levels and, consequently, earlier mortality than *MRL/lpr* controls [95], indicating that loss of CFH accelerated the development of lupus nephritis. A relevant feature of these mice was excessive interstitial infiltration of phagocytes and neutrophils.

Given the direct influence that complement can exert over DC functional outcomes and the central role of DCs in autoimmune pathology, it seems reasonable considering the use of complement components to induce tolDCs for therapeutic intervention. Indeed, several ongoing or recently completed phase I clinical trials have set up to explore the effectiveness of *ex vivo*-generated, monocyte-derived tolDCs for the treatment of autoimmune diseases such as type 1 diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and Crohn's disease, and are under consideration for SLE [96,97]. Thus, complement effectors (C1q, iC3b, C5a...) or inhibitors (C4BP(β-), FH), according to their mechanism of action, might outperform the current agents (vitamin D₃, immunosuppressants...), improving the cellular effectiveness of

tolDCs regarding their *in vivo* viability and stability of the immune hyporesponsiveness to disease-specific self-antigens in the pro-inflammatory autoimmune environment.

Alternatively, direct *in vivo* administration of complement components taking advantage of the restricted immune specificity of their interacting receptor(s) and/or their mechanism of action, or devising approaches for DC targeting such as the use of nanotechnology and biomaterials [98,99] might improve therapeutic efficacy and specificity, and decrease adverse effects including increased risk of infections, observed after repeated administration of the currently employed immunosuppressive drugs and glucocorticoids.

7. Concluding remarks and perspectives

Although canonical functions of complement components in the fight against pathogens are pro-inflammatory and immunogenic, recent studies are unveiling their dichotomous behavior, depending on the microenvironmental cues. Thus, an increasing list of complement effectors has been shown to be capable to skew DCs toward an immature, tolerogenic and anti-inflammatory phenotype, particularly under homeostatic conditions such as in apoptotic cell and immune complex clearance. Other mechanisms of complement-mediated tolerogenesis induction in DCs include: 1) use of alternative receptors by complement effectors [100]; and 2) crosstalk between TLRs and complement receptors co-expressed on DCs [101] (Fig. 1). Furthermore, the considerable size and modular architecture of soluble complement inhibitors such as C4BP and CFH supports also a different function of separate domains for the complement inhibitory activity and for cell surface binding and tolerogenic signaling [80,84]. Other recently discovered unconventional functions of the complement system such as the intracellular complement or complosome [102] may also reveal additional ways of DC modulation. It will also be relevant deciphering the precise contributions of autocrine and paracrine DC signaling induced by complement effectors, and predicting the overall DC polarizing response depending on the strength of positive and negative signals from these locally-acting mediators. In that sense, it has been shown that ectosomes shed from human platelets, containing a variety of complement components (complement inhibitors: CD55, CD59, and proteins acquired from plasma: C1q, C3 fragments, CFH) are able to modify macrophage and DC differentiation toward less reactive states [103].

The pathogenesis of autoimmune diseases is complex and, currently, the outcome of complement-derived therapeutics both in animal models and in patients is still difficult to predict [104,105]. Certainly, novel complement-related drugs should not be solely focused on inhibition of complement activation, but ought to also consider their additional direct or indirect effects acting as ligands of known or, as yet, unknown DC receptors. A precise knowledge of the molecular mechanisms of action of the individual complement effectors and modulators over DCs as organizers and orchestrators of the host immune response, and the consequences of this crosstalk over other effector immune cells in the complex inflammatory environments of autoimmune or alloimmune pathologies will surely improve the therapeutic landscape for a truly effective and safe personalized medicine.

Acknowledgments

J.M.A. received support from Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, Spain) (grants FIS-ISCIH P13/01490 and P116/00377, co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-a way to build Europe-), from "La Marató de TV3" Foundation (grant 12/1210), and from Generalitat

de Catalunya (grant 2014SGR541). J.M.A. is sponsored by the “Researchers Consolidation Program” from the SNS-Dpt. Salut Generalitat de Catalunya (Exp. CES06/012).

References

- [1] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392 (6673) (1998) 245–252.
- [2] K.P. Van Gisbergen, L.C. Paessens, T.B. Geijtenbeek, Y. Van Kooyk, Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement, *Immunol. Lett.* 97 (2) (2005) 199–208.
- [3] C. Ohnmacht, A. Pullner, S.B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, D. Voehringer, Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity, *J. Exp. Med.* 206 (3) (2009) 549–559.
- [4] D. Ricklin, E.S. Reis, J.D. Lambris, Complement in disease: a defence system turning offensive, *Nat. Rev. Nephrol.* 12 (7) (2016) 383–401.
- [5] L. Perié, S.H. Naik, Toward defining a lineage –The case for dendritic cells, *Semin. Cell Dev. Biol.* 41 (2015) 3–8.
- [6] M. Collin, V. Bigley, Monocyte, macrophage, and dendritic cell development: the human perspective, *Microbiol. Spectr.* 4 (5) (2016) 1–17.
- [7] F. Sallusto, A. Lanzavecchia, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha, *J. Exp. Med.* 179 (4) (1994) 1109–1118.
- [8] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation, *Immunity* 38 (2) (2013) 336–348.
- [9] Y. Xu, Y. Zhan, A.M. Lew, S.H. Naik, M.H. Kershaw, Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking, *J. Immunol.* 179 (11) (2007) 7577–7584.
- [10] T.P. Manh, Y. Alexandre, T. Baranek, K. Crozat, M. Dalod, Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation, *Eur. J. Immunol.* 43 (7) (2013) 1706–1715.
- [11] J. Idoyaga, C. Fiorese, L. Zbytniuk, A. Lubkin, J. Miller, B. Malissen, D. Mucida, M. Merad, R.M. Steinman, Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction, *J. Clin. Invest.* 123 (2) (2013) 844–854.
- [12] R. Kushwah, J. Wu, J.R. Oliver, G. Jiang, J. Zhang, K.A. Siminovich, J. Hu, Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg, *Eur. J. Immunol.* 40 (4) (2010) 1022–1035.
- [13] G. Süss, K. Shortman, A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis, *J. Exp. Med.* 183 (4) (1996) 1789–1796.
- [14] T. Izawa, T. Kondo, M. Kurosawa, R. Oura, K. Matsumoto, E. Tanaka, A. Yamada, R. Arakaki, Y. Kudo, Y. Hayashi, N. Ishimaru, Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice, *PLoS One* 7 (12) (2012) 1–12.
- [15] F. Fallarino, C. Vacca, C. Orabona, M.L. Belladonna, R. Bianchi, B. Marshall, D.B. Keskin, A.L. Mellor, M.C. Fioretti, U. Grohmann, P. Puccetti, Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8(+) dendritic cells, *Int. Immunol.* 14 (1) (2002) 65–68.
- [16] S. Yamazaki, T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, R.M. Steinman, Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells, *J. Exp. Med.* 198 (2) (2003) 235–247.
- [17] E.C. Rosser, C. Mauri, Perspective Regulatory B cells: origin, phenotype, and function, *Immunity* 42 (4) (2015) 607–612.
- [18] R. Volchenkov, M. Karlsen, R. Jonsson, S. Appel, Type 1 regulatory T cells and regulatory B cells induced by tolerogenic dendritic cells, *Scand. J. Immunol.* 77 (4) (2013) 246–254.
- [19] D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (3) (2009) 162–174.
- [20] V.K. Raker, M.P. Domogalla, K. Steinbrink, Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–11.
- [21] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka, Immunobiology of dendritic cells, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 767–811.
- [22] G. Bajic, S.E. Degen, S. Thiel, G.R. Andersen, Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases, *EMBO J.* 34 (22) (2015) 2735–2757.
- [23] J.A. Schatz-Jakobsen, D.V. Pedersen, G.R. Andersen, Structural insight into proteolytic activation and regulation of the complement system, *Immunol. Rev.* 274 (1) (2016) 59–73.
- [24] R.B. Sim, W. Schwaebler, T. Fujita, Complement research in the 18th–21st centuries: progress comes with new technology, *Immunobiology* 221 (10) (2016) 1037–1045.
- [25] M. Botto, M. Kirschfink, P. Macor, M.C. Pickering, R. Würzner, F. Tedesco, Complement in human diseases: lessons from complement deficiencies, *Mol. Immunol.* 46 (14) (2009) 2774–2783.
- [26] Q. Peng, K. Li, H. Patel, S.H. Sacks, W. Zhou, Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype, *J. Immunol.* 176 (6) (2006) 3330–3341.
- [27] Q. Peng, K. Li, K. Anderson, C.A. Farrar, B. Lu, R.A. Smith, S.H. Sacks, W. Zhou, Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a C3aR interaction, *Blood* 111 (4) (2008) 2452–2461.
- [28] P. Baruah, I.E. Dumitriu, T.H. Malik, H.T. Cook, J. Dyson, D. Scott, E. Simpson, M. Botto, C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells, *Blood* 113 (15) (2009) 3485–3493.
- [29] E.S. Reis, J.A. Barbuto, L. Isaac, Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins, *Inflamm. Res.* 55 (5) (2006) 179–184.
- [30] E.S. Reis, A.M. Barbuto, L. Isaac, Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells, *Immunobiology* 212 (3) (2007) 151–157.
- [31] K. Li, H. Fazekasova, N. Wang, P. Sagoo, Q. Peng, W. Khamri, C. Gomes, S.H. Sacks, G. Lombardi, W. Zhou, Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells, *Mol. Immunol.* 48 (9–10) (2011) 1121–1127.
- [32] F. Petry, M. Botto, R. Holtappels, M.J. Walport, M. Loos, Reconstitution of the complement function in C1q-deficient (C1qa^{-/-}) mice with wild-type bone marrow cells, *J. Immunol.* 167 (7) (2001) 4033–4037.
- [33] A.K. Hogasen, R. Würzner, T.G. Abrahamson, M.P. Dierich, Human polymorphonuclear leukocytes store large amounts of terminal complement components C7 and C6, which may be released on stimulation, *J. Immunol.* 154 (9) (1995) 4734–4740.
- [34] M. Martin, A.M. Blom, Complement in removal of the dead-balancing inflammation, *Immunol. Rev.* 274 (1) (2016) 218–232.
- [35] G. Castellano, A.M. Woltman, A.J. Nauta, A. Roos, L.A. Trouw, M.A. Seelen, F.P. Schena, M.R. Daha, C. Van Kooten, Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro, *Blood* 103 (10) (2004) 3813–3820.
- [36] C.A. Ogden, A. deCathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, P.M. Henson, C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macrophagocytosis and uptake of apoptotic cells, *J. Exp. Med.* 194 (6) (2001) 781–795.
- [37] E.V. Clarke, B.M. Weist, C.M. Walsh, A.J. Tenner, Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation, *J. Leukoc. Biol.* 97 (1) (2015) 147–160.
- [38] M.C. Pulanco, J. Cosman, M.M. Ho, J. Huynh, K. Fing, J. Turcu, D.A. Fraser, Complement protein C1q enhances macrophage foam cell survival and efferocytosis, *J. Immunol.* 198 (1) (2017) 472–480.
- [39] M. Yamada, K. Oritani, T. Kaisho, J. Ishikawa, H. Yoshida, I. Takahashi, S. Kawamoto, N. Ishida, H. Ujiie, H. Masai, M. Botto, Y. Tomiyama, Y. Matsuzawa, Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 34 (1) (2004) 221–230.
- [40] D.A. Fraser, A.K. Laust, E.L. Nelson, A.J. Tenner, C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells, *J. Immunol.* 183 (10) (2009) 6175–6185.
- [41] B.K. Teh, J.G. Yeo, L.M. Chem, J. Lu, C1q regulation of dendritic cell development from monocytes with distinct cytokine production and T cell stimulation, *Mol. Immunol.* 48 (9–10) (2011) 1128–1138.
- [42] S.N. Waggoner, M.W. Cruise, R. Kassel, Y.S. Hahn, gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway, *J. Immunol.* 175 (7) (2005) 4706–4714.
- [43] B. Ghebrehiwet, K.H. Hosszu, E.I. Peerschke, C1q as an autocrine and paracrine regulator of cellular functions, *Mol. Immunol.* 84 (2017) 26–33.
- [44] K.K. Hosszu, A. Valentino, U. Vinayagasundaram, R. Vinayagasundaram, M.G. Joyce, Y. Ji, E.I. Peerschke, B. Ghebrehiwet, DC-SIGN, C1q, and gC1qR form a trimolecular receptor complex on the surface of monocyte-derived immature dendritic cells, *Blood* 120 (6) (2012) 1228–1236.
- [45] C. Lood, B. Gullstrand, L. Truedsson, A.E. Olin, G.V. Alm, L. Rönnblom, G. Sturfelt, M. Eloranta, A.A. Bengtsson, C1q inhibits immune complex-induced interferon- α production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis, *Arthritis Rheum.* 60 (10) (2009) 3081–3090.
- [46] L. Mascarell, S. Airouche, N. Berjont, C. Gary, C. Gueguen, G. Fourcade, B. Bellier, D. Togbe, B. Ryffel, D. Klatzmann, V. Baron-Bodo, P. Moingeon, The regulatory dendritic cell marker C1q is a potent inhibitor of allergic inflammation, *Mucosal Immunol.* 10 (3) (2017) 695–704.
- [47] M. Son, F. Santiago-Schwarz, Y. Al-Abed, B. Diamond, C1q limits dendritic cell differentiation and activation by engaging LAIR-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (46) (2012) E3160–E3167.
- [48] M. Son, B. Diamond, B.T. Volpe, C.B. Aranow, M.C. Mackay, F. Santiago-Schwarz, Evidence for C1q-mediated crosslinking of CD33/LAIR-1 inhibitory immunoreceptors and biological control of CD33/LAIR-1 expression, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1–13.
- [49] K.K. Hosszu, F. Santiago-Schwarz, E.I. Peerschke, B. Ghebrehiwet, Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity, *Innate Immun.* 16 (2) (2010) 115–127.
- [50] K. Gomi, Y. Tokue, T. Kobayashi, H. Takahashi, A. Watanabe, T. Fujita, T. Nukiwa, Mannose-binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections, *Chest* 126 (1) (2004) 95–99.
- [51] M.M. Dean, R.L. Flower, D.P. Eisen, R.M. Minchin, D.N. Hart, S. Vuckovic, Mannose-binding lectin deficiency influences innate and

- antigen-presenting functions of blood myeloid dendritic cells, *Immunology* 132 (2) (2011) 296–305.
- [52] M. Wang, Y. Zhang, Y. Chen, L. Zhang, X. Lu, Z. Chen, Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide, *BMC Immunol.* 12 (1) (2011) 1–10.
- [53] H. Liu, J. Zhou, D. Ma, X. Lu, S. Ming, G. Shan, X. Zhang, J. Hou, Z. Chen, D. Zuo, Mannan binding lectin attenuates double-stranded RNA-mediated TLR3 activation and innate immunity, *FEBS Lett.* 588 (6) (2014) 866–872.
- [54] J.G. Yeo, J. Leong, T. Arkachaisri, Y. Cai, B.H. Teo, J.H. Tan, L. Das, J. Lu, Proteolytic inactivation of nuclear alarmin high-mobility group box 1 by complement protease C1s during apoptosis, *Cell Death Discov.* 2 (2016) 1–9.
- [55] C.C. Hsieh, H.S. Chou, H.R. Yang, F. Lin, S. Bhatt, J. Qin, L. Wang, J.J. Fung, S. Qian, L. Lu, The role of complement component 3 (C3) in differentiation of myeloid-derived suppressor cells, *Blood* 121 (10) (2013) 1760–1768.
- [56] J.H. Sohn, P.S. Bora, H.J. Suk, H. Molina, H.J. Kaplan, N.S. Bora, Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells, *Nat. Med.* 9 (2) (2003) 206–212.
- [57] M. È. Lebel, M.P. Langlois, J.F. Daudelin, E. Tarrab, P. Savard, D. Leclerc, A. Lamarre, Complement component 3 regulates IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells following TLR7 activation by a plant virus-like nanoparticle, *J. Immunol.* 198 (1) (2017) 292–299.
- [58] K. Li, H. Fazekasova, N. Wang, Q. Peng, S.H. Sacks, G. Lombardi, W. Zhou, Functional modulation of human monocytes derived DCs by anaphylatoxins C3a and C5a, *Immunobiology* 217 (1) (2012) 65–73.
- [59] A. Zaal, S.N. Lissenberg-Thunnissen, G. Van Schijndel, D. Wouters, S.M. Van Ham, A. Ten Brinke, Crosstalk between Toll like receptors and C5a receptor in human monocyte derived DCs suppress inflammatory cytokine production, *Immunobiology* 218 (2) (2013) 175–180.
- [60] A. Zaal, B. Nota, K.S. Moore, M. Dieker, S.M. Van Ham, A. Ten Brinke, TLR4 and C5aR crosstalk in dendritic cells induces a core regulatory network of RSK2, PI3Kbeta, SGK1, and FOXO transcription factors, *J. Leukoc. Biol.* 102 (4) (2017) 1035–1054.
- [61] X. Zhang, I.P. Lewkowich, G. Köhl, J.R. Clark, M. Wills-Karp, J. Köhl, A protective role for C5a in the development of allergic asthma associated with altered levels of B7-H1 and B7-DC on plasmacytoid dendritic cells, *J. Immunol.* 182 (8) (2009) 5123–5130.
- [62] J. Köhl, R. Baelder, I.P. Lewkowich, M.K. Pandey, H. Hawlisch, L. Wang, J. Best, N.S. Herman, A.A. Sproles, J. Zwirner, J.A. Whitsett, C. Gerard, G. Sfyroera, J.D. Lambris, M. Wills-Karp, A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma, *J. Clin. Invest.* 116 (3) (2006) 783–796.
- [63] S. Lajoie, I.P. Lewkowich, Y. Suzuki, J.R. Clark, A.A. Sproles, K. Dienger, A.L. Budelsky, M. Wills-Karp, Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma, *Nat. Immunol.* 11 (10) (2010) 928–935.
- [64] X. Zhang, I. Schmutz, Y. Laumonnier, M.K. Pandey, J.R. Clark, P. König, N.P. Gerard, C. Gerard, M. Wills-Karp, J. Köhl, A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma, *J. Immunol.* 185 (11) (2010) 6741–6752.
- [65] R. Li, L.G. Coulthard, S.M. Wu, T.M. Woodruff, C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a, *FASEB J.* 27 (3) (2013) 855–864.
- [66] X. Luo, L. Liu, N. Tang, K.M. Lu, T.S. McCormick, K. Kang, K.D. Cooper, Inhibition of monocyte-derived dendritic cell differentiation and interleukin-12 production by complement iC3b via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway, *Exp. Dermatol.* 14 (4) (2005) 303–310.
- [67] S. Lukács, Z. Nagy-Baló, A. Erdei, N. Sándor, Z. Bajtai, The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4(CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes, *Immunol. Lett.* 189 (2017) 64–72.
- [68] L. Vogt, N. Schmitz, M.O. Kurrer, M. Bauer, H.J. Hinton, S. Behnke, D. Gatto, P. Sebbel, R.R. Beerli, I. Sonderegger, M. Kopf, P. Saudan, M.F. Bachmann, VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation, *J. Clin. Invest.* 116 (10) (2006) 2817–2826.
- [69] S. Xu, Z. Sun, L. Li, J. Liu, J. He, D. Song, G. Shan, H. Liu, X. Wu, Induction of T cells suppression by dendritic cells transfected with VSIG4 recombinant adenovirus, *Immunol. Lett.* 128 (1) (2010) 46–50.
- [70] Y. Yang, E.K. Chung, Y.L. Wu, S.L. Savelli, H.N. Nagaraja, B. Zhou, M. Hebert, K.N. Jones, Y. Shu, K. Kitzmiller, C.A. Blanchong, K.L. McBride, G.C. Higgins, R.M. Rennebohm, R.R. Rice, K.V. Hackshaw, R.A. Roubey, J.M. Grossman, B.P. Tsao, D.J. Birmingham, B.H. Rovin, L. Chen, Y.H. Liang, H.F. Pan, Z.F. Pan, Q.H. Zhang, Q. Li, T.X. Du, Y.M. Lv, J.Q. Shi, Complement C4 induces regulatory T cells differentiation through dendritic cell in systemic lupus erythematosus, *Cell Biosci.* 5 (2015) 1–8.
- [71] P. Leungwutiwong, W. Itriprasert, K. Saikhun, P. Tong-Ngam, S. Akapirat, S. Chattanade, Y. Kitiyanant, Impairment of CD4+ CD25+ regulatory T cells in C4-deficient mice, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 29 (3) (2011) 220–228.
- [72] H.B. Cheng, R.Y. Chen, J.P. Wu, L. Chen, Y.H. Liang, H.F. Pan, Z.F. Pan, Q.H. Zhang, Q. Li, T.X. Du, Y.M. Lv, J.Q. Shi, Complement C4 induces regulatory T cells differentiation through dendritic cell in systemic lupus erythematosus, *Cell Biosci.* 5 (2015) 1–8.
- [73] J. Hofer, F. Forster, D.E. Isenman, M. Wahrman, J. Leitner, M.A. Hölzl, J.J. Kovarik, H. Stockinger, G.A. Böhmig, P. Steinberger, G.J. Zlabinger, Ig-like transcript 4 as a cellular receptor for soluble complement fragment C4d, *FASEB J.* 30 (4) (2016) 1492–1503.
- [74] P.F. Zipfel, C. Skerka, Complement regulators and inhibitory proteins, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (10) (2009) 729–740.
- [75] M.D. Kirkitadze, P.N. Barlow, Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation, *Immunol. Rev.* 180 (2001) 146–161.
- [76] P.N. Lalli, M.G. Strainic, F. Lin, M.E. Medof, P.S. Heeger, Decay accelerating factor can control T cell differentiation into IFN- γ -producing effector cells via regulating local C5a-induced IL-12 production, *J. Immunol.* 179 (9) (2007) 5793–5802.
- [77] L. Kask, A. Hillarp, B. Ramesh, B. Dahlbäck, A.M. Blom, Structural requirements for the intracellular subunit polymerization of the complement inhibitor C4b-binding protein, *Biochemistry* 41 (30) (2002) 9349–9357.
- [78] D. Ermert, A.M. Blom, C4b-binding protein: the good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend, *Immunol. Lett.* 169 (2016) 82–92.
- [79] O. Criado García, P. Sánchez-Corral, S. Rodríguez de Córdoba, Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines, *J. Immunol.* 155 (8) (1995) 4037–4043.
- [80] R. Olivari, A. Luque, M. Naranjo-Gómez, J. Quer, P. Garcia de Frutos, F.E. Borrás, S. Rodríguez de Córdoba, A.M. Blom, J.M. Aran, The α 7B0 isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells, *J. Immunol.* 190 (6) (2013) 2857–2872.
- [81] N. Morita, T. Yamazaki, Y. Murakami, R. Fukui, I. Yamai, I. Ichimonji, A. Nakashima, F. Nagaoka, H. Takagi, K. Miyake, S.A. Takamura, C4b-binding protein negatively regulates TLR4/MD-2 response but not TLR3 response, *FEBS Lett.* 591 (12) (2017) 1732–1741.
- [82] M. Józsi, M. Opperman, J.D. Lambris, P.F. Zipfel, The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection, *Mol. Immunol.* 44 (10) (2007) 2697–2706.
- [83] S.R. de Córdoba, E.G. de Jorge, Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H, *Clin. Exp. Immunol.* 151 (1) (2008) 1–13.
- [84] R. Olivari, A. Luque, S. Cárdenas-Brito, M. Naranjo-Gómez, A.M. Blom, F.E. Borrás, S.R. de Córdoba, P.F. Zipfel, J.M. Aran, The complement inhibitor factor H generates an anti-inflammatory and tolerogenic state in monocyte-derived dendritic cells, *J. Immunol.* 196 (10) (2016) 4274–4290.
- [85] M. Józsi, P.F. Zipfel, Factor H family proteins and human diseases, *Trends Immunol.* 29 (8) (2008) 380–387.
- [86] K.E. Lintner, Y.L. Wu, Y. Yang, C.H. Spencer, G. Hauptmann, L.A. Hebert, J.P. Atkinson, C.Y. Yu, Early components of the complement classical activation pathway in human systemic autoimmune diseases, *Front. Immunol.* 7 (36) (2016) 1–22.
- [87] S.J. Kim, B. Diamond, Modulation of tolerogenic dendritic cells and autoimmunity, *Semin. Cell Dev. Biol.* 41 (2015) 49–58.
- [88] J.P. Mackern-Oberst, C. Llanos, F. Vega, F. Salazar-Onfray, C.A. Riedel, S.M. Bueno, A.M. Kalergis, Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases, *Autoimmun. Rev.* 14 (2) (2015) 127–139.
- [89] F. Yu, M. Haas, R. Glasscock, M.H. Zhao, Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes, *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (8) (2017) 483–495.
- [90] L.J. Carreño, R. Pacheco, M.A. Gutierrez, S. Jacobelli, M.A. Kalergis, Disease activity in systemic lupus erythematosus is associated with an altered expression of low-affinity Fc gamma receptors and costimulatory molecules on dendritic cells, *Immunology* 128 (3) (2009) 334–341.
- [91] M. Botto, C. Dell’Agnola, A.E. Bygrave, E.M. Thompson, H.T. Cook, F. Petry, M. Loos, P.P. Pandolfi, M.J. Walport, Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies, *Nat. Genet.* 19 (1) (1998) 56–59.
- [92] S. Thanei, M. Trendelenburg, Anti-C1q autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients induce a proinflammatory phenotype in macrophages, *J. Immunol.* 196 (5) (2016) 2063–2074.
- [93] Y. Richaud-Patin, B. Pérez-Romano, E. Carrillo-Maravilla, A.B. Rodriguez, A.J. Simon, J. Cabiedes, J. Jazek-Ocampo, L. Llorente, A. Ruiz-Argüelles, Deficiency of red cell bound CD5s and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus, *Immunol. Lett.* 88 (2) (2003) 95–99.
- [94] S.E. Wenderfer, H. Wang, B. Ke, R.A. Wetsel, M.C. Braun, C3a receptor deficiency accelerates the onset of renal injury in the MRL/lpr mouse, *Mol. Immunol.* 46 (7) (2009) 1397–1404.
- [95] L. Bao, M. Haas, R.J. Quigg, Complement factor H deficiency accelerates development of lupus nephritis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (2) (2011) 285–295.
- [96] B.E. Phillips, Y. Garciafigueroa, M. Trucco, N. Giannoukakis, Clinical tolerogenic dendritic cells: exploring therapeutic impact on human autoimmune disease, *Front. Immunol.* 8 (1279) (2017) 1–9.
- [97] P. García-González, G. Ubilla-Olquín, D. Catalán, K. Schinnerling, J.C. Aguillón, Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases, *Autoimmun. Rev.* 15 (11) (2016) 1071–1080.
- [98] L.H. Tostanoski, E.A. Gosselin, C.M. Jewell, Engineering tolerance using biomaterials to target and control antigen presenting cells, *Discov. Med.* 21 (117) (2016) 403–410.
- [99] Y. Jang, J.A. Champion, Self-assembled materials made from functional recombinant proteins, *Acc. Chem. Res.* 49 (10) (2016) 2188–2198.

- [100] D.J. Weaver, E.S. Reis, M.K. Pandey, G. Köhl, N. Harris, C. Gerard, J. Köhl, C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells, *Eur. J. Immunol.* 40 (3) (2010) 710–721.
- [101] M. Wang, J.L. Krauss, H. Domon, K.B. Hosur, S. Liang, P. Magotti, M. Triantafylou, K. Triantafylou, J.D. Lambris, G. Hajishgeallis, Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk, *Sci. Signal.* 3 (109) (2010) 1–16 (ra11).
- [102] M.K. Liszewski, M. Elvington, H.S. Kulkarni, J.P. Atkinson, Complement's hidden arsenal: new insights and novel functions inside the cell, *Mol. Immunol.* 84 (2017) 2–9.
- [103] S. Sadallah, C. Eken, P.J. Martin, A.J. Schifferli, Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells, *J. Immunol.* 186 (11) (2011) 6543–6552.
- [104] L. Bao, P.N. Cunningham, R.J. Quigg, Complement in lupus nephritis: new perspectives, *Kidney Dis. (Basel)* 1 (2) (2015) 91–99.
- [105] L.A. Trouw, M.C. Pickering, A.M. Blom, The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease, *Nat. Rev. Rheumatol.* 13 (9) (2017) 538–547.



Noncanonical immunomodulatory activity of complement regulator C4BP(β^-) limits the development of lupus nephritis

Ana Luque^{1,6}, Inmaculada Serrano^{1,6}, Elia Ripoll², Catarina Malta¹, Montserrat Gomà³, Anna M. Blom⁴, Josep M. Grinyó², Santiago Rodríguez de Córdoba⁵, Joan Torras² and Josep M. Aran¹

¹Immune-inflammatory Processes and Gene Therapeutics Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ²Nephrology Department, Bellvitge University Hospital, Experimental Nephrology Laboratory, University of Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ³Pathology Department, Bellvitge University Hospital, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁴Section of Medical Protein Chemistry, Department of Translational Medicine, Lund University, Malmö, Sweden; and ⁵Department of Cellular and Molecular Medicine, Center for Biological Research and Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases, Madrid, Spain

Lupus nephritis is a chronic autoimmune-inflammatory condition that can lead to end-stage kidney disease. Presently available immunosuppressive treatments for lupus nephritis are suboptimal and can induce significant side effects. Recently, we characterized a novel immunomodulatory activity of the minor isoform of the classical pathway complement inhibitor, C4BP(β^-). We show here that C4BP(β^-) treatment prevented the development of proteinuria and albuminuria, decreased significantly the formation of anti-dsDNA antibodies and, locally, mitigated renal glomerular IgG and C3 deposition and generation of apoptotic cells. There was a consequent histological improvement and increased survival in lupus-prone mice. The therapeutic efficacy of C4BP(β^-) was analogous to that of the broad-acting immunosuppressant cyclophosphamide. Remarkably, a comparative transcriptional profiling analysis revealed that the kidney gene expression signature resulting from C4BP(β^-) treatment turned out to be 10 times smaller than that induced by cyclophosphamide treatment. C4BP(β^-) immunomodulation induced significant downregulation of transcripts relevant to lupus nephritis indicating immunopathogenic cell infiltration, including activated T cells (*Lat*), B cells (*Cd19*, *Ms4a1*, *Tnfrsf13c*), inflammatory phagocytes (*Irf7*) and neutrophils (*Prtn3*, *S100a8*, *S100a9*). Furthermore, cytokine profiling and immunohistochemistry confirmed that C4BP(β^-), through systemic and local CXCL13 downregulation, was able to prevent ectopic lymphoid structures neogenesis in aged mice with lupus nephritis. Thus, due to its anti-inflammatory and

immunomodulatory activities and high specificity, C4BP(β^-) could be considered for further clinical development in patients with systemic lupus erythematosus.

Kidney International (2020) **97**, 551–566; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.10.016>

KEYWORDS: C4BP(β^-); dendritic cells; ectopic lymphoid structures; immunomodulation; inflammation; lupus nephritis

Copyright © 2019, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Translational Statement

Lupus nephritis is a chronic autoimmune inflammatory condition for which current treatments with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and immunosuppressive drugs, and even with new biologics, remain unsatisfactory and/or induce nonspecific adverse events. Therefore, novel therapeutic agents are needed with increased potency, selectivity, and safety profiles. We have recently characterized a novel immunomodulatory activity in the minor isoform of the complement inhibitor C4BP(β^-). Here we show that this noncanonical activity limits the evolution of lupus nephritis in lupus-prone mice, preventing the development of CXC chemokine ligand 13–driven renal ectopic lymphoid structures. Thus, the anti-inflammatory and tolerogenic functions of C4BP(β^-) might contribute significantly to restore immune homeostasis and to achieve better outcomes in lupus nephritis management.

Correspondence: Josep M. Aran, Immune-inflammatory Processes and Gene Therapeutics Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Gran Via s/n km 2,7, 08908 Barcelona, Spain. E-mail: jaran@idibell.cat

⁶AL and IS are equal contributors.

Received 21 December 2018; revised 2 October 2019; accepted 3 October 2019; published online 6 November 2019

Systemic lupus erythematosus (SLE) is heterogeneous in nature with regard to organ involvement, clinical manifestations, and severity, although the most life-threatening trait is progressive nephritis, leading to end-stage renal disease.¹ A key early event in lupus nephritis (LN) involves impaired myeloid phagocytes, which, unable to clear apoptotic cell debris and/or neutrophil extracellular traps, initiate a Toll-like receptor (TLR)–mediated

proinflammatory program leading to direct activation of effector T cells and indirect activation of B cells through the production of important mediators such as B cell-activating factor.²⁻⁴ In turn, stimulation and increased survival of B cells lead to the production of pathogenic autoantibodies against nuclear components (e.g., nucleic acids and histones), local parenchymal immune complex (IC) deposition, and activation of the complement system as well as additional production of proinflammatory chemokines and cytokines such as type I interferons.⁵ These events induce a self-sustaining feed-forward loop of chronic inflammation and progressive glomerular, tubulointerstitial, and endothelial kidney damage. In fact, focal infiltration and progressive organized aggregation of immune cells are the hallmarks of autoreactive ectopic lymphoid structures (ELs), also known as tertiary lymphoid organs, developing in both human LN and murine LN.^{3,6} Thus, circulating and resident immune cells become important causative agents in the promotion of proinflammatory renal injury through ELS expansion, which maximizes the encounters between autoantigens, antigen-presenting cells, and lymphocytes, which is important for the local initiation and maintenance of adaptive immune responses. This knowledge framework offers an insight for the development of targeted immunotherapy interventions able to halt tissue damage and chronic inflammation by restoring operational immune tolerance. Accordingly, a new group of biologics, mostly neutralizing antibodies directed against proinflammatory molecular targets or cellular leukocyte subsets, such as rituximab, eculizumab, or belimumab, are on preclinical or early clinical development aiming to become efficient immunomodulatory agents without the unwanted effects of broad-based immunosuppression displayed by conventional therapy, such as long-term toxicity by cyclophosphamide (CYP) and steroids. However, thus far the therapeutic benefit of biologics for inflammatory renal disease has been limited.⁷

Synthesized mainly in the liver, C4b-binding protein (C4BP), a main regulator of the complement system, is relatively abundant in the circulation as a major heterooligomer ($\alpha 7\beta 1$, or C4BP[$\beta+$]) and a minor homoooligomer ($\alpha 7\beta 0$, or C4BP[$\beta-$]) that becomes significantly upregulated under inflammatory conditions (e.g., acute phase response).^{8,9} Both isoforms are able to inhibit the classical and lectin pathways of complement activation.¹⁰ In addition, C4BP($\beta+$), through its β chain, forms a high-affinity complex with protein S, which endows it with additional roles in coagulation and in apoptotic cell binding.^{11,12} Alternatively, we have recently described a novel anti-inflammatory and immunomodulatory activity of human C4BP($\beta-$) capable of inducing a myeloid-derived suppressor cell-like phenotype through its direct action on monocyte-derived dendritic cells (DCs), an established model of inflammatory DCs.¹³

In this study we aimed to assess the therapeutic potential of C4BP($\beta-$) in experimental autoimmune LN. We show that C4BP($\beta-$), but not C4BP($\beta+$), mitigates the development of renal injury in lupus-prone NZBW F1 and MRL-*lpr* mice, preventing the neogenesis of autoreactive

ELs, which hold a key role in locally enhancing renal maladaptive immune response and chronic inflammation.

RESULTS

C4BP($\beta-$) preserves renal function in lupus-prone NZBW F1 mice

As we previously reported,¹³ human C4BP($\beta-$) confers a semimature, anti-inflammatory phenotype to lipopolysaccharide-matured monocyte-derived DCs from healthy individuals. Thus, we first sought to confirm the immunomodulatory activity of human C4BP($\beta-$) in a mouse background. C4BP($\beta-$) treatment prevented the upregulation of CD80 and CD86 costimulatory molecule expression by cultured bone marrow-derived DCs stimulated with the TLR7 agonist gardiquimod, which is of relevance in LN pathology¹⁴ (Supplementary Figure S1).

To assess the therapeutic potential of C4BP($\beta-$) in experimental autoimmune LN, we designed a schedule for i.p. administration of this human plasma-purified protein into lupus-prone NZBW F1 mice (Figure 1a). Proteinuria is the most prominent and life-threatening sign in LN mice. It reflects renal dysfunction and closely correlates with disease outcome. In phosphate-buffered saline (PBS) vehicle-treated control mice, proteinuria began to develop at week 28 and progressed exponentially to severe proteinuria (>300 mg/kg) by week 34 (8.5 months of age) up to the end of the study (week 36). In comparison, the onset of proteinuria was delayed until the end of the study by C4BP($\beta-$) treatment and was significantly reduced from the level in the control PBS vehicle-treated group ($P < 0.0001$) (Figure 1b). Thus, neither the standard CYP treatment group nor the C4BP($\beta-$) treatment group developed noteworthy proteinuria over time. Nonetheless, a slight upturn in proteinuria, particularly evident as microalbuminuria, appeared by week 36 in the C4BP($\beta-$) treatment group compared with the CYP treatment group (Figure 1c). This apparently decreased therapeutic efficacy of C4BP($\beta-$) at later stages of treatment could reflect accelerated clearance because of the development of an immune xenoresponse against the administered human protein in NZBW F1-immunocompetent mice.¹⁵ Certainly, repeated C4BP($\beta-$) administration induced the production of anti-C4BP($\beta-$)-specific antibodies that were detected in the sera of the treated animals, peaking around week 32 (Supplementary Figure S2).

In an additional set of experiments, we confirmed that as little as 50 μ g of purified C4BP($\beta-$) produced in human embryonic kidney 293 (HEK293) mammalian cells per mouse, administered biweekly and s.c., was still able to ameliorate the renal function and increase the survival of nephritic NZBW F1 mice, despite the comparable immunogenicity of both plasma-purified and recombinant C4BP($\beta-$) (Supplementary Figure S3).

C4BP($\beta-$) attenuates the development of anti-double-stranded DNA antibodies and ameliorates histologic damage in the kidneys of lupus-prone NZBW F1 mice

The autoantibody titers directly reflect autoimmunity status. In the vehicle PBS-instilled control NZBW F1 mice, serum

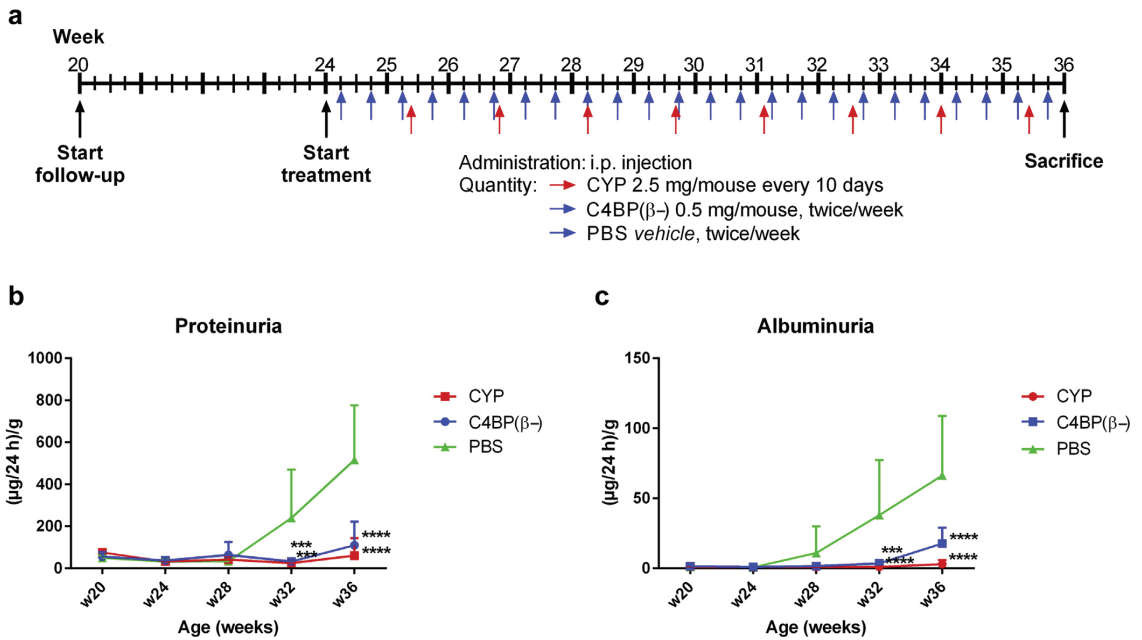


Figure 1 | Renal function determination in lupus-prone NZBW F1 mice. Schematic dosage for i.p. injection of C4b-binding protein homooligomer (C4BP(β^-)) and vehicle (phosphate-buffered saline [PBS]) (blue arrows) and cyclophosphamide (CYP) (red arrows) into lupus-prone NZBW F1 mice (a). Proteinuria and albuminuria were monitored monthly over the course of the assay, and all animals were killed at week 36 (w36). Total 24-hour urinary protein was determined by pyrogallol red-molybdate protein dye-binding assay (b) and 24-hour urinary albumin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (c) as described in the Methods. Data are normalized by mouse weight and expressed as mean \pm SD. $n = 4\text{--}8$ mice per group. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with control PBS-treated mice.

anti-double-stranded DNA (dsDNA) total Igs began to progressively increase at 5 to 6 months of age (weeks 20–24). Within another 3 months, anti-dsDNA Igs reached its highest titer, which persisted thereafter (Figure 2a). In comparison, mice from the C4BP(β^-) group had a sustained lower level of autoantibodies throughout the analysis period (weeks 28–36) ($P < 0.05$). As expected, the standard CYP treatment group also showed reduced anti-dsDNA autoantibody levels.

Even though proteinuria reflects the severity of renal dysfunction, the pathological study directly reveals tissue damage in LN. The common characteristics of severe nephritis in lupus kidneys include proliferative changes in the mesangial and endothelial cells of the glomeruli, capillary basement membrane thickening, severe interstitial infiltrates, tubular atrophy, and large protein casts. Figure 2b–d compares representative renal histologic findings in the C4BP(β^-) and CYP treatment groups and in the PBS-treated vehicle control group. The 9-month-old control PBS-treated mice exhibited typical nephritic changes, including significantly enlarged and hypercellular glomeruli (Figure 2c), interstitial inflammation, and widespread proteinaceous tubular casts, as expected from their severe proteinuria. Conversely, age-matched mice in both the C4BP(β^-) and CYP treatment groups presented almost intact glomeruli, tubules, and interstitium, with lower pathological scores

(Figure 2b–d). Thus, C4BP(β^-) treatment attenuated the development of anti-dsDNA antibodies, protecting kidneys from autoantibody-induced damage.

Renal IC deposits and apoptotic cells are significantly reduced in C4BP(β^-)-treated lupus-prone NZBW F1 mice

IC deposits in the kidneys provide direct evidence for the pathogenicity of the autoantibodies in the target organ and are associated with nephritis in NZBW F1 mice.¹⁶ We stained renal cryosections for IgG and C3, 2 major components in IC. In the vehicle-treated PBS control mice, there was pronounced IgG and C3 deposition in the glomeruli (Figure 3a), which was markedly diminished in both C4BP(β^-)-treated and CYP-treated mice ($P < 0.0001$). Therefore, the IC deposits were consistent with the renal histopathological changes.

Impaired clearance of apoptotic debris and IgG ICs by phagocytes is considered to be one of the main causes of inflammation associated with LN.¹⁷ Indeed, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling analysis revealed the widespread presence of both intraglomerular and extraglomerular apoptotic cells in the kidneys of PBS-treated mice. In contrast, both C4BP(β^-)- and CYP-treated mice had essentially no apoptotic cells in the renal cortex (Figure 3b), correlating with reduced kidney damage.

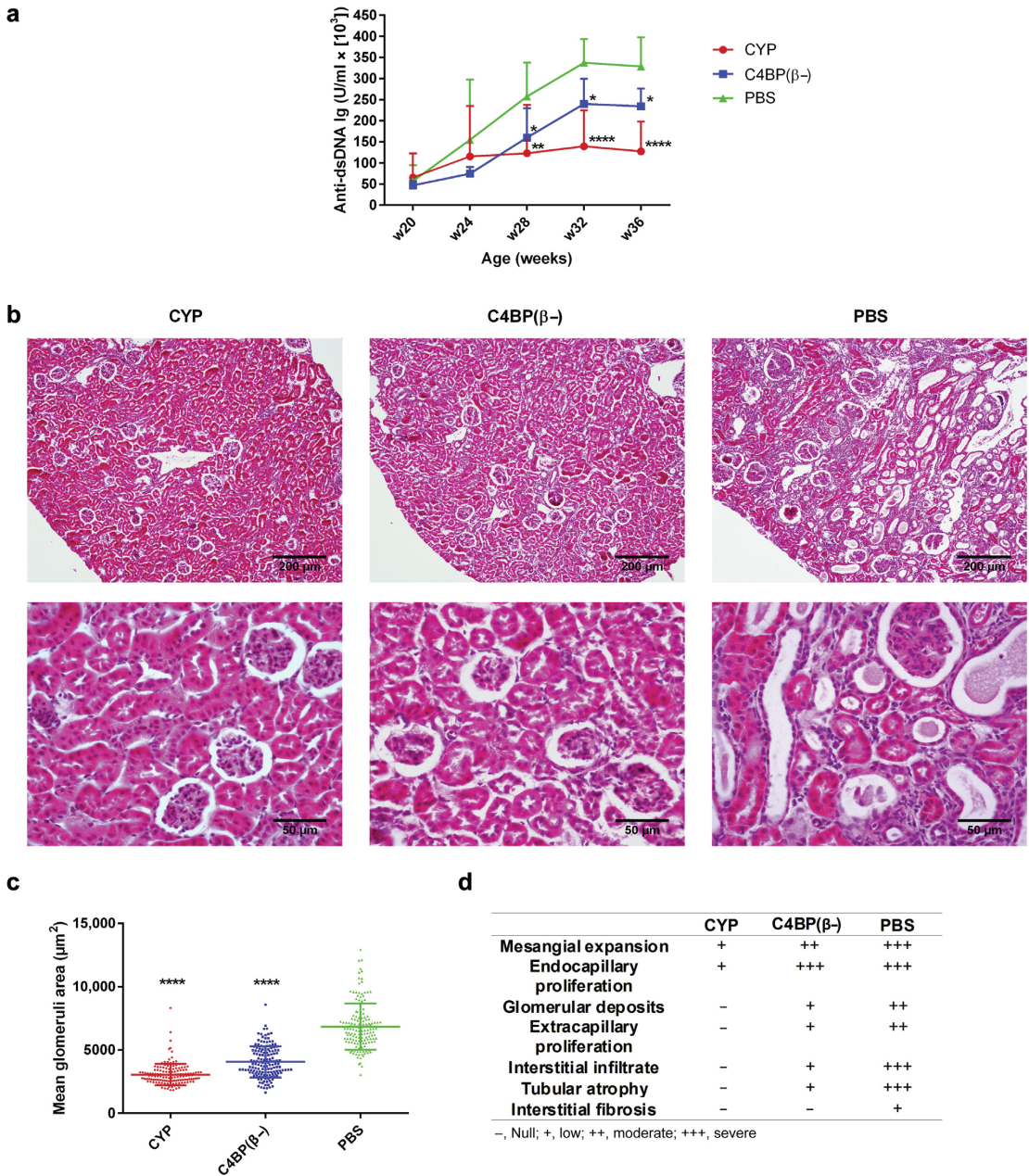


Figure 2 | Anti-double-stranded DNA (dsDNA) autoantibody production and renal histology assessment in lupus-prone NZBW F1 mice. Serum levels of anti-dsDNA antibodies correlating with disease activity were measured by enzyme-linked immunosorbent assay from week 20 (pretreatment) to week 36 (a). Data are expressed as mean \pm SD. $n = 7$ mice per group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ compared with vehicle phosphate-buffered saline (PBS)-treated mice. Representative sections of the renal cortex from cyclophosphamide (CYP)- (left), C4b-binding protein homooligomer (C4BP(β^-))- (center), and vehicle PBS-treated (right) 36-week-old NZBW F1 mice stained with hematoxylin and eosin (b). Images are shown at low (upper panels, bars = 200 μm) and high (lower panels, bars = 50 μm) magnification. The data obtained were used to comparatively evaluate the glomeruli area (c) and semiquantitatively grade histopathology traits indicating active lupus nephritis (mesangial expansion, endocapillary proliferation, glomerular deposits, extracapillary proliferation, and interstitial infiltrates) as well as chronic lesions (tubular atrophy and interstitial fibrosis) (d). To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

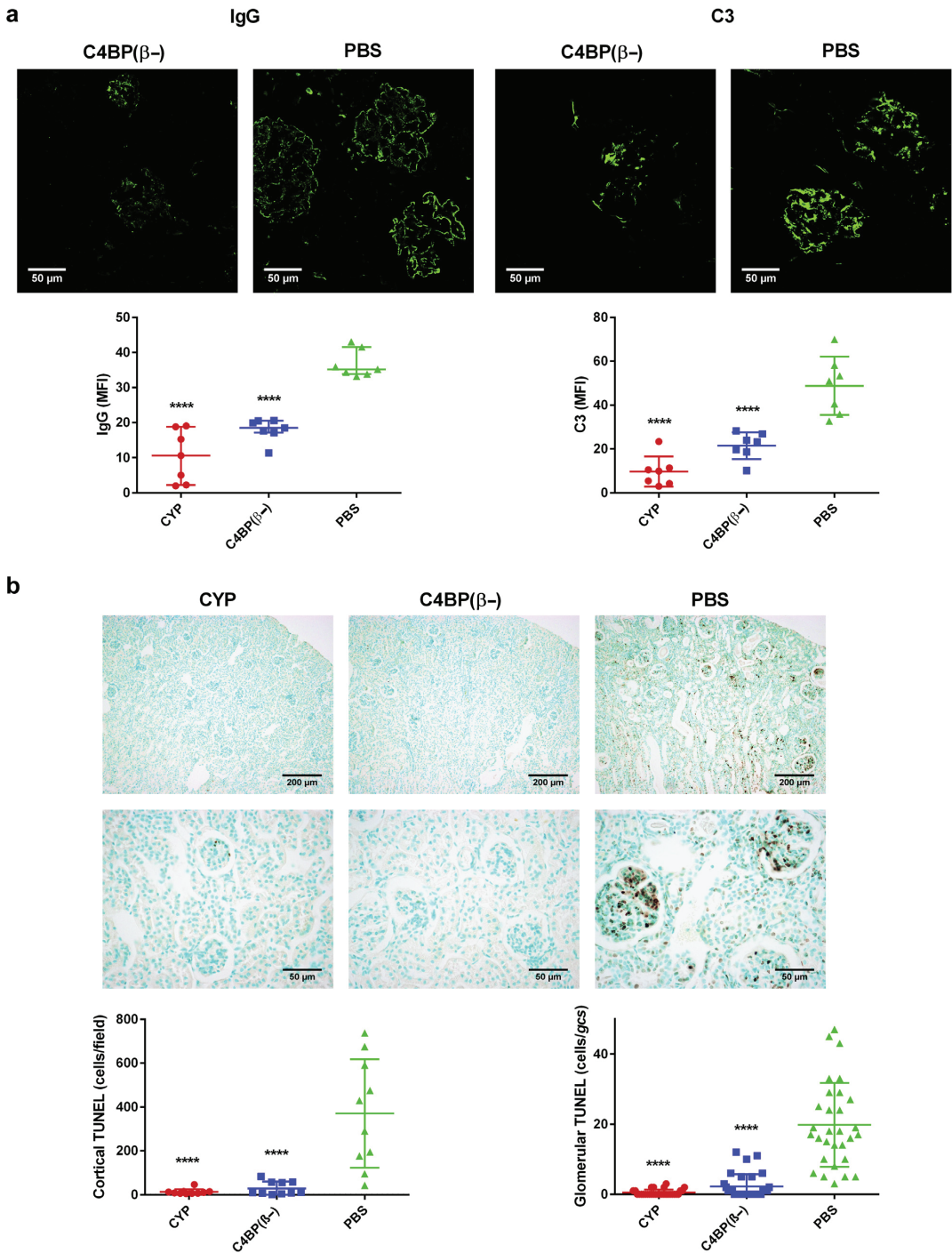


Figure 3 | Immunohistochemical analysis of IgG and C3 deposits and evaluation of apoptosis in the renal cortex of lupus-prone NZBW F1 mice. For analysis of local IgG and C3 deposition, fluorescent staining of renal cryosections was performed (a). Representative fluorescent images from IgG- and C3-stained vehicle phosphate-buffered saline (PBS)- and C4b-binding protein homooligomer (C4BP[β^-])-treated (continued)

C4BP(β⁻) targets molecular/cellular hallmarks of LN

To gain further insight into the local immunomodulatory events induced by C4BP(β⁻) treatment at the molecular and cellular level, we performed a comparative transcriptional profiling of renal tissue from C4BP(β⁻), CYP-, and PBS-treated control NZBW F1 mice. The in-house designed array included 377 genes involved in SLE pathology (Supplementary Table S1). Remarkably, an initial evaluation of the expression profiles of C4BP(β⁻)- and CYP-treated mice, both relative to PBS-treated control mice, unveiled a drastically different appearance in their overall shape (Figure 4a). Accordingly, only 24 differentially expressed transcripts (fold change ≥ 1.8) were apparent between the C4BP(β⁻)- and PBS-treated kidneys (Supplementary Table S2). Conversely, the same analysis when comparing CYP-treated and PBS-treated kidneys yielded 224 differentially regulated transcripts (Supplementary Table S3). Taking into account the comparable therapeutic efficacies of C4BP(β⁻) and CYP treatments in LN mice, as perceived from the previously analyzed parameters, this outcome suggests more specific immunomodulation induced by C4BP(β⁻) over the immunosuppressant CYP in nephritic NZBW F1 mice.

An additional gene interaction-based bioinformatics analysis of the analyzed genes revealed that relevant biological functions modulated by C4BP(β⁻) treatment involved reduced renal leukocyte migration, particularly of myeloid cells, and consequently a decreased quantity and activation of infiltrated mononuclear leukocytes, predominantly B lymphocytes (Supplementary Table S4). Conversely, a large number of additional relevant pathways, such as the complement pathway, were appreciably regulated only by CYP treatment (data not shown), suggesting increased toxicity of the immunosuppressant CYP compared with C4BP(β⁻).

Next, we validated the above-mentioned results obtained with the microfluidic cards by analyzing renal tissue from individual mice within each group by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and interrogating the transcripts that showed differential regulation by C4BP(β⁻) at fold change ≥ 2.0 in the array. We confirmed a significant differential C4BP(β⁻)-mediated downregulation of 8 transcripts: *Irf7*, *Lat*, *Cd19*, *Ms4a1* (*Cd20*), *Tnfrsf13c* (*BAFFR*), *Prtn3*, *S100a8*, and *S100a9* (Figure 4b). All but *S100a8* and *S100a9*, encoding the S100a8/S100a9 complex calprotectin involved in inflammasome activation and myelopoiesis induction, were found also significantly downregulated by CYP treatment. Strikingly, although *Irf7* is a key transcription factor involved in the type I interferon pathway activated by innate sensors, such as TLR7/8, as a consequence of impaired lysosomal maturation of SLE phagocytes,² all other transcripts are

cellular markers specific for activated T lymphocytes (*Lat*), B lymphocytes (*Cd19*, *Ms4a1*, and *Tnfrsf13c*), and neutrophils (*Prtn3*, *S100a8*, and *S100a9*). This again indicates significant leukocyte infiltration, suggesting a lack of immune tolerance as the underlying cause of LN pathology in the kidneys of PBS-treated control NZBW F1 mice, which, however, could be mitigated by both C4BP(β⁻) and standard CYP treatments. Furthermore, an assessment of the network crosstalk between the C4BP(β⁻) gene set including the above-mentioned 8 significantly regulated genes and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways using PathwAX (<http://pathwax.sbc.su.se/>) reflected a significant (false discovery rate ≤ 0.05) depletion of immune hematopoietic cells and, particularly, of the B-cell signaling and the proinflammatory nuclear factor κB pathways in C4BP(β⁻)-treated renal tissue compared with the PBS-treated nephritic tissue (Table 1).

C4BP(β⁻) modulates the cytokine signature of lupus-prone NZBW F1 mice

To complement the transcriptional profiling results obtained, we examined the presence of inflammatory cytokines in the sera of the treated NZBW F1 mice at the end of the study. Remarkably, a cytokine array including 40 mouse cytokines, chemokines, and acute phase proteins evidenced CXC chemokine ligand 13 (CXCL13) as the unique cytokine differentially abundant, present in PBS-treated mice but absent in C4BP(β⁻)- or CYP-treated mice (Figure 5a). This homeostatic B cell-attracting chemokine, produced by macrophages and DCs, is extremely relevant in SLE renal pathology. We confirmed the array findings assessing the CXCL13 levels in the sera of individual mice through a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Figure 5b).

An identical cytokine analysis, using renal tissue extracts instead of sera, endorsed differential expression of CXCL13 and additionally revealed the local presence of the C5/C5a complement components and of the interleukin-1 (IL-1) family members IL-1 receptor antagonist (IL-1ra; IL-1F3) and IL-1β (Figure 5c and d). Thus, a local increase in these inflammatory factors, while apparent in PBS-treated kidneys, could be prevented by C4BP(β⁻) or CYP treatment.

C4BP(β⁻) treatment prevents leukocyte infiltration and the development of ELSs in the renal parenchyma of lupus-prone NZBW F1 mice

LN, a chronic inflammatory condition, features significant leukocyte infiltration over time, as suggested by our transcriptional profiling data. Indeed, a thorough immunohistochemical examination regarding the presence of

Figure 3 | (continued) NZBW F1 mice (upper panels). Fluorescence was expressed as mean fluorescence intensity (MFI) ± SD. n = 7 mice per group. ****P < 0.0001 compared with vehicle PBS-treated mice (lower panels). Apoptosis in the renal cortex was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay (b). Representative images from the renal cortex of cyclophosphamide (CYP)-, C4BP(β⁻), and vehicle PBS-treated NZBW F1 mice are shown at low and high magnification. Cortical apoptotic cells were scored as cell number per field (left graph) and glomerular apoptotic cells as cell number per glomerular cut section (gcs) (right graph). Data are expressed as mean ± SD. n = 3 mice per group. ****P < 0.0001 compared with vehicle PBS-treated mice. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

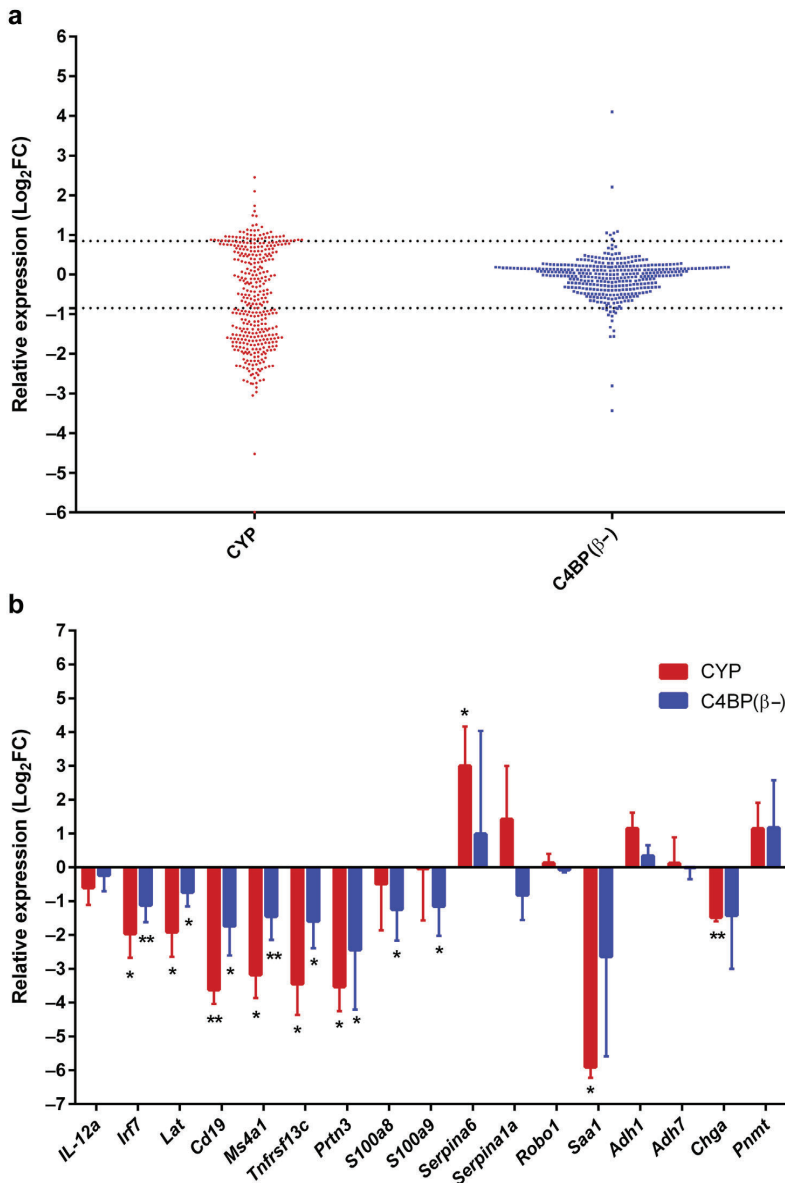


Figure 4 | Comparative transcriptional profiling of renal tissue from lupus-prone NZBW F1 mice. Overall comparative transcriptional profiles of 36-week-old renal tissue from cyclophosphamide (CYP)- and C4b-binding protein homooligomer (C4BP[β^-])-treated mice relative to the 36-week-old nephritic transcriptional profile displayed by renal tissue from vehicle phosphate-buffered saline (PBS)-treated mice (a). Total renal RNA was interrogated against a panel of 377 murine genes relevant in lupus nephritis pathology. Gene expression data are given as log_2FC (FC, fold change). The discontinuous horizontal lines indicate an FC threshold of ± 1.8 for upregulated and downregulated genes. TaqMan quantitative reverse transcription polymerase chain reaction individual validation of all genes showing an FC induction of ≥ 2 in the C4BP(β^-) transcriptional profile (b). Relative expression data for the specified genes were obtained from renal RNA of individual mice belonging to each treatment group. $n = 3-5$ mice per group. Log_2FC values are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle PBS-treated mice.

inflammatory leukocyte markers in the renal cortex of 36-week-old PBS-treated NZBW F1 mice evidenced positive staining, mainly perivascular and occasionally periglomerular,

not only for activated T cells (Lat) and B cells (CD19) but also for different myeloid cell populations: neutrophils (Gr1), interstitial monocytes/macrophages (F4/80), and DCs

Table 1 | Pathway annotation of NZBW F1 renal genes downregulated by C4BP(β-) treatment based on the network crosstalk (PathwAX)

Pathway class	Order number ^a	Relevant pathway	FWER	Network connectivity of C4BP(β-)-induced genes (links)							
				<i>Ms4a1</i>	<i>Prtn3</i>	<i>Tnfrsf13c</i>	<i>Lat</i>	<i>Cd19</i>	<i>S100a8</i>	<i>S100a9</i>	<i>Irf7</i>
Human diseases	14	Systemic lupus erythematosus	2.20×10^{-3}	5 ^b	1 ^b	0	0	0	0	0	1 ^b
Organismal systems	2	Hematopoietic cell lineage	1.53×10^{-14}	4 ^c	0	1 ^b	4 ^b	4 ^c	0	0	0
	3	B-cell receptor–signaling pathway	1.68×10^{-12}	3 ^b	0	2 ^b	3 ^b	0	0	0	1 ^b
	15	Antigen processing and presentation	2.46×10^{-3}	5 ^b	1 ^b	0	1 ^b	0	0	0	0
Environmental information processing	18	T-cell receptor–signaling pathway	6.01×10^{-3}	1 ^b	0	0	7 ^c	0	0	0	0
	4	Nuclear factor κB–signaling pathway	2.27×10^{-9}	3 ^b	0	0	5 ^c	2 ^b	0	1 ^b	1 ^b
	6	Cell adhesion molecules	2.44×10^{-6}	7 ^b	0	0	2 ^b	1 ^b	0	0	0
	12	Cytokine–cytokine receptor interaction	9.62×10^{-4}	4 ^b	0	0	0	2 ^b	0	0	1 ^b

0–7, degree of connectivity; C4BP(β-), C4b-binding protein homooligomer; FWER, family-wise error rate.

^aThe results are sorted by increasing FWER.

^bQuery genes linked to the pathway.

^cGenes that are part of the pathway.

(CD11c). In contrast, the above-mentioned markers were barely present (F4/80) or virtually absent in both C4BP(β-) and CYP-treated mice (Figure 6).

The chemokine CXCL13 holds a key role in recruiting and organizing nodular aggregates of B cells, activated T cells, and DCs surrounded by neo-lymphatic vessels termed ELSs.¹⁸

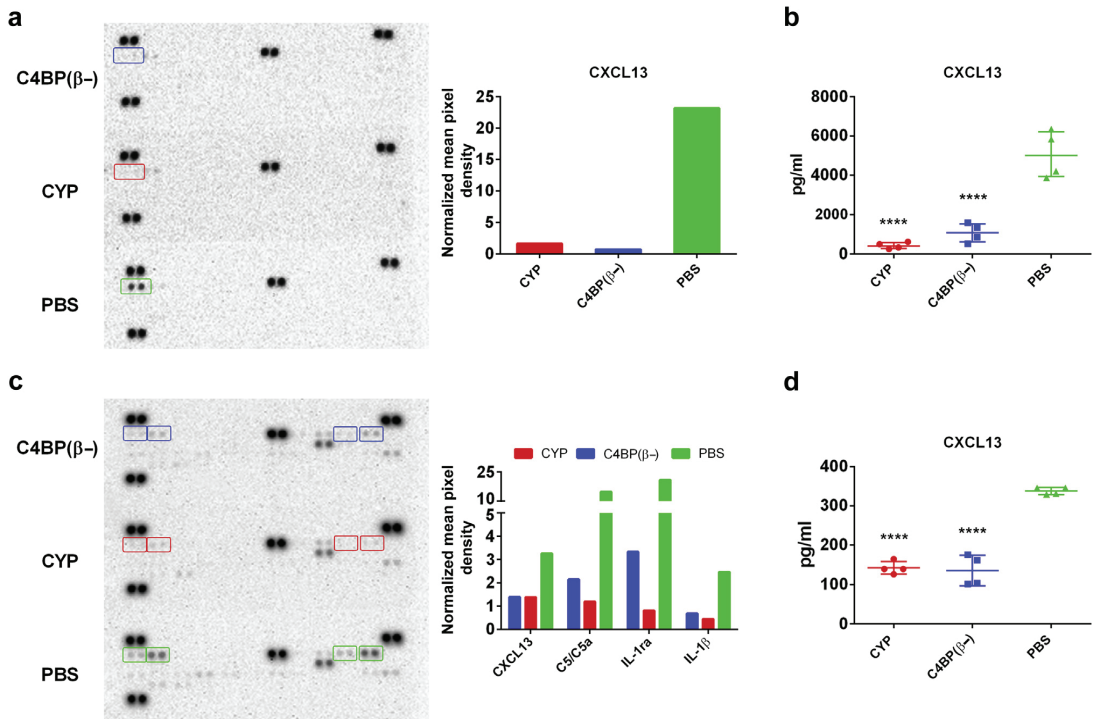


Figure 5 | Circulating and renal cytokine profile from lupus-prone NZBW F1 mice. Sera (a) and renal tissue extracts (c) were incubated with the Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer’s instructions. The density of each dot was quantified with Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA) and displayed as normalized mean pixel density for each relevant cytokine and treatment. Additional validation of the chemokine CXCL13 was performed in individual mouse samples (n = 4 mice per group) by a specific enzyme-linked immunosorbent assay (b,d). Data are expressed as mean ± SD. ****P < 0.0001 compared with vehicle phosphate-buffered saline (PBS)-treated mice. C4BP(β-), C4b-binding protein homooligomer; CYP, cyclophosphamide; IL-1β, interleukin-1β; IL-1ra, interleukin-1 receptor antagonist. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

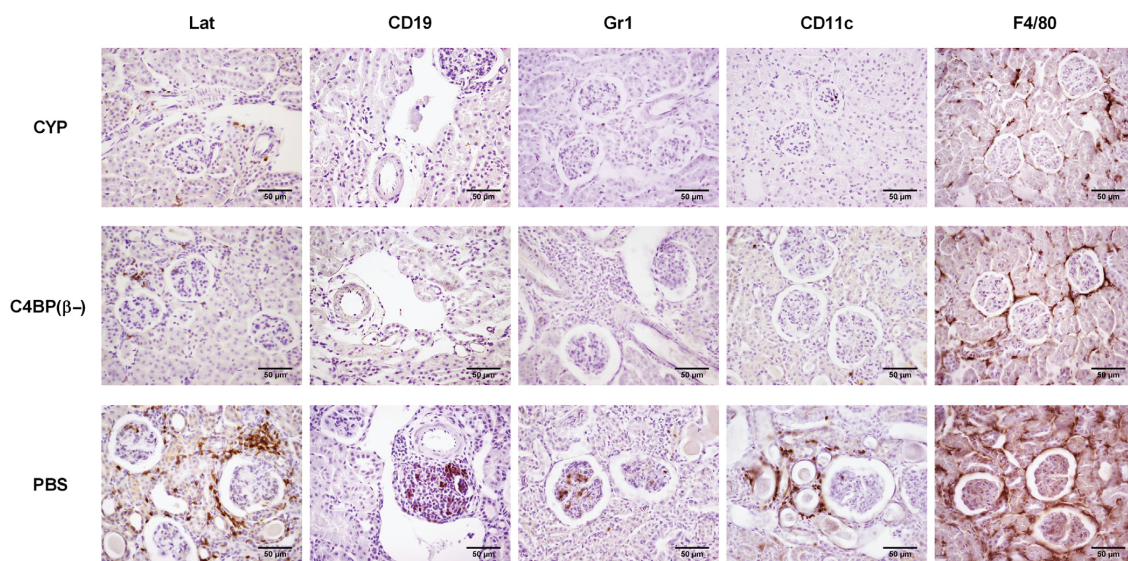


Figure 6 | Immunohistochemistry of the renal cortex from lupus-prone NZBW F1 mice. Assessment of immune cell infiltrates in renal cortex sections from cyclophosphamide (CYP)-, C4b-binding protein homooligomer (C4BP(β^-))- and vehicle phosphate-buffered saline (PBS)-treated 36-week-old NZBW F1 mice at the end of the study. Local intense perivascular, periglomerular, and/or glomerular staining was observed in vehicle PBS-treated kidneys surveyed for activated T cells (Lat), B cells (CD19), and myeloid cells such as neutrophils (Gr1), dendritic cells (CD11c), and monocytes/macrophages (F4/80), the last one presenting strong and diffuse periglomerular staining (lower panels). Conversely, CYP- (upper panels) and C4BP(β^-)-treated (middle panels) kidneys were found scarcely stained for the above-referred inflammatory markers. Bars = 50 μ m. The results from each panel are representative of staining performed on tissue from 3 animals in each group. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

Indeed, we confirmed the presence of multiple ELSs in the cortex of PBS-treated NZBW F1 nephritic mice by hematoxylin and eosin staining and by T-cell (Lat) and B-cell (Cd19) immunostaining (Figure 7). In contrast, C4BP(β^-) immunomodulatory activity prevented the development of local inflammatory ELSs in these mice, which correlated with reduced anti-dsDNA autoantibody formation and renal function improvement.

The complement inhibitory activity of C4BP does not affect LN pathology in lupus-prone NZBW F1 mice

To assess whether C4BP-mediated complement inhibition could be responsible for the improvement in LN, we performed a comparative study administering equal amounts of either the minor isoform C4BP(β^-), sustaining both complement inhibitory and immunomodulatory activities, or the major isoform C4BP(β^+), holding only the complement inhibitory but not the immunomodulatory activity,¹³ into NZBW F1 mice. C4BP(β^-)-treated mice showed reduced proteinuria, decreased anti-dsDNA and blood urea nitrogen levels, improved renal histology with minimal immune cell infiltration, and a higher survival rate when compared with C4BP(β^+)-treated mice (Supplementary Figure S4). Furthermore, we analyzed the activity of the classical pathway of complement in fresh serum extracted from NZBW F1 mice previously (week 21) and at several points during C4BP treatment (weeks 25, 29, and 33). Complement activity was

nearly within the normal range in young mice, before beginning C4BP treatment, but was concomitantly reduced with the progression of LN pathology in both PBS- and C4BP(β^+)-treated mice (Supplementary Figure S5). A severe drop in hemolytic complement activity ahead of clinical renal disease has been reported in these mice, which suggested consumption by ICs.¹⁹ In contrast, C4BP(β^-) treatment significantly precluded hypocomplementemia at the early stages of treatment. Nevertheless, complement exhaustion could not be prevented at the later stages of treatment, possibly owing to a lack of C4BP(β^-) immunomodulatory efficacy because of the development of the anti-human C4BP(β^-) immune xenoreponse, as previously indicated.

Therapeutic efficacy of C4BP(β^-) in lupus-prone MRL-*lpr* mice

We substantiated the above-mentioned results and the overall therapeutic efficacy of C4BP(β^-) immunomodulation using MRL-*lpr* mice as an alternative spontaneous LN model. Thus, a weekly treatment schedule using 100 μ g of C4BP(β^-) per mouse beginning at 10 weeks of age not only mitigated the development of proteinuria, increased survival, preserved renal histology preventing ectopic lymphoid tissue formation, and increased survival rate but also ameliorated dermatitis and vasculitis, other SLE pathological traits developing in the MRL-*lpr* model (Figure 8).

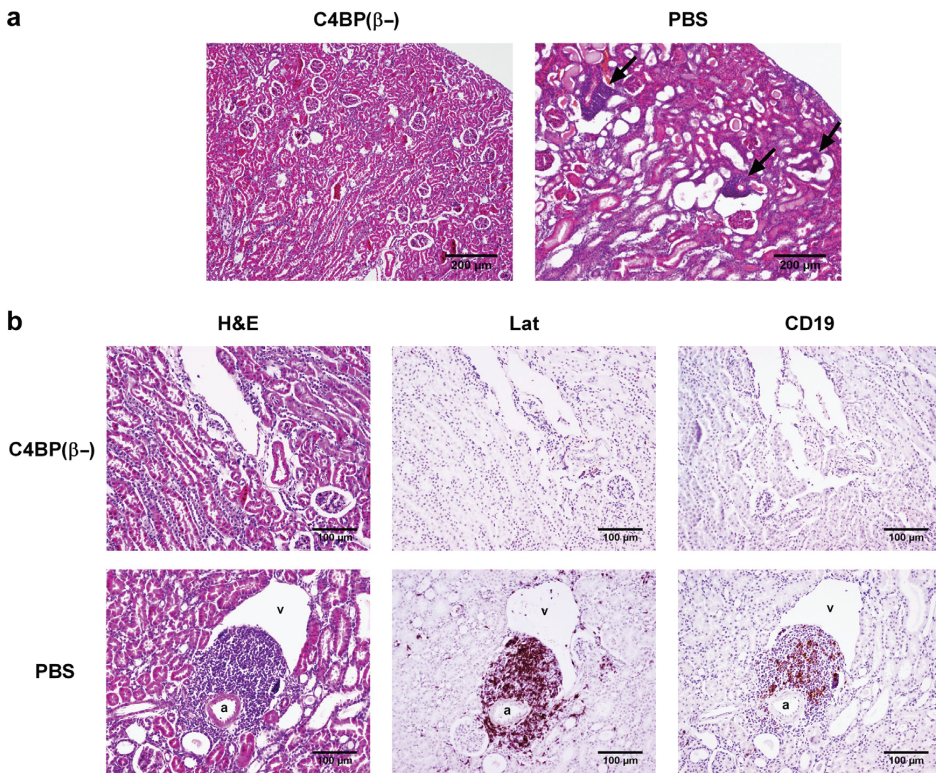


Figure 7 | C4b-binding protein homooligomer (C4BP[β^-]) treatment prevents the development of ectopic lymphoid structures (ELs) in lupus-prone NZBW F1 mice. Low-resolution hematoxylin and eosin (H&E)-stained representative renal cortex sections from C4BP(β^-)- (left) and vehicle phosphate-buffered saline (PBS)-treated (right) 36-week-old NZBW F1 mice (upper panels). ELs are clearly visible in PBS-treated mice (black arrows), but absent in C4BP(β^-)-treated mice. Bars = 200 μ m (a). Representative images from 4 mice per group. Consecutive renal sections from C4BP(β^-)- and PBS-treated mice stained with hematoxylin and eosin (left) and immunostained with Lat (activated T-cell marker) (center) and CD19 (B-cell marker) (right) (lower panels). Note the colocalization of T and B cells within a well-developed ELS surrounding an arteriole (a) and next to a vein (v) in the higher magnification images from the PBS-treated renal cortex. ELs are virtually nonexistent in the C4BP(β^-)-treated renal cortex. Bars = 100 μ m (b). To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

DISCUSSION

In this report we demonstrate the benefit of human C4BP(β^-), an acute phase protein with a well-known complement inhibitory function and with a previously unrecognized and recently characterized anti-inflammatory and tolerogenic activity toward inflammatory DCs in 2 spontaneous models of autoimmune LN: NZBW F1 and MRL-*lpr* mice. A prior study has reported the potential of human C4BP(β^-) inhibiting the development of autoimmune arthritis in mice, which was exclusively attributed to its complement inhibitory activity.²⁰ However, the fast systemic clearance of human C4BP(β^-) when administered to mice²⁰ suggests that an alternative mode of action of C4BP(β^-) might contribute significantly to the substantial therapeutic effect noticed in the arthritis models used. In fact, we show here that the major C4BP(β^+) isoform, holding the same complement inhibitory activity as C4BP(β^-) but lacking immunomodulatory activity,¹³ does not affect the development

of LN in NZBW F1 mice. Furthermore, C4BP(β^-), but not C4BP(β^+), was able to prevent in these mice the progress to hypocomplementemia, an important marker of the presence of IC-mediated disease. It has been shown that complement titers fall significantly with renal disease progression, concomitantly with the appearance of anti-DNA autoantibodies in serum and of C3 Igs in renal glomeruli.¹⁹ Nonetheless, we acknowledge C4BP(β^-) action limiting both C3 deposition in the glomeruli and the presence of C5/C5a in the renal cortex of C4BP(β^-)-treated NZBW F1 mice. In fact, inhibition of complement activity at different points, such as through monoclonal antibody-mediated C5 blockade²¹ using C3a²² or C5a²³ receptor antagonists, or by CR2-targeted complement inhibitors such as CR2-DAF,²⁴ CR2-Crry,²⁵ or CR2-FH,²⁶ has proven useful in the amelioration of LN. Yet the deposition of ICs or complement does not seem sufficient for renal pathology.²⁷⁻²⁹ In our study, although CYP, a broad-spectrum immunosuppressant and standard-of-care treatment of the most severe

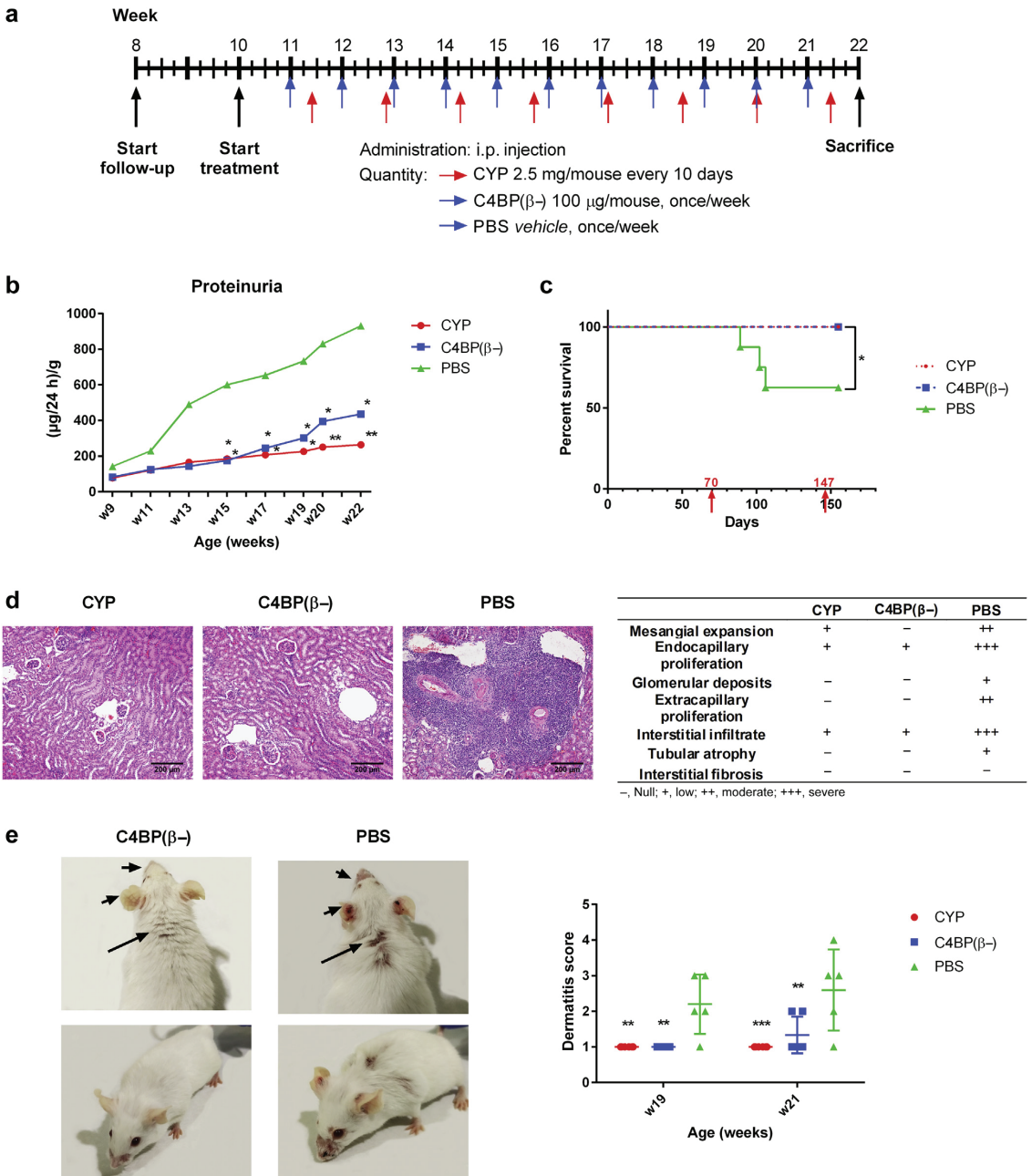


Figure 8 | C4b-binding protein homooligomer (C4BP[β-]) attenuates autoimmune lupus manifestations in MRL-*lpr* mice. Schematic dosage for i.p. injection of C4BP(β-) and vehicle (phosphate-buffered saline [PBS]) (blue arrows) and cyclophosphamide (CYP) (red arrows) into MRL-*lpr* mice (a). Proteinuria was monitored bimonthly (unless otherwise stated) over the course of the assay from week 9 (w9) until week 22 (w22) (b). Total 24-hour urinary protein was determined by pyrogallol red-molybdate protein dye-binding assay. Data are normalized by mouse weight and expressed as cumulative mean. PBS, n = 8; C4BP(β-) and CYP, n = 6. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with control PBS-treated mice. Kaplan-Meier survival curves of lupus-prone MRL-*lpr* mice. Cumulative survival curves showed 100% survival in CYP- and C4BP(β-)-treated mice (8 of 8) and 62.5% survival in PBS-treated mice (5 of 8) at the end of the study (day 147). Red arrows identify the start (day 70) and the end (day 147) of the treatment period. n = 6–8 mice per group. **P* < 0.05 compared with vehicle PBS-treated mice; log-rank test (c). Representative sections of the renal cortex from CYP- (left), C4BP(β-)- (center), and (continued)

manifestations of SLE,³⁰ induced a transcriptional down-regulation of several complement effectors in renal tissue from NZBW F1 mice, no such modulation was observed upon C4BP(β -) treatment. Nevertheless, the therapeutic efficiency of C4BP(β -) was comparable to that exhibited by CYP. Moreover, scaling down 10-fold the s.c. dosage of C4BP(β -) to 50 μ g/mouse and setting up a biweekly administration schedule were still able to significantly ameliorate disease severity in LN mice.

Mouse C4BP lacks both the β chain³¹ and 2 complement control protein domains in the α chain homologous to complement control protein 5 and complement control protein 6 from the human C4BP α chain.³² We have previously described that complement control protein 6 is necessary for the immunomodulatory activity of human C4BP(β -).¹³ Hence, the mouse constitutes a suitable animal model to assess the immunomodulatory activity of human C4BP(β -) without interference from the endogenous mouse C4BP. Certainly, C4BP knockout did not develop any autoimmune phenotype and did not modify disease severity in MRL-*lpr* LN mice,³³ stressing the relevance of human C4BP(β -) immunomodulation in NZBW F1 LN pathology.

Both C4BP(β -)¹³ and the major alternative pathway complement inhibitor factor H,³⁴ through as yet unknown receptor(s), directly counteract cellular immune-inflammatory activation by inducing an anti-inflammatory and tolerogenic state on monocyte-derived DCs analogous to that recently described for monocytic myeloid-derived suppressor cells, which confer suppressive activity toward multiple myeloid and lymphoid cell subsets.^{35,36} Remarkably, myeloid cells seem to take a central pathogenic role in SLE owing to inefficient clearance of apoptotic cell debris and autoantigen-autoantibody ICs by phagocytosis because of defects in lysosomal maturation.² Thus, Fc γ RI-mediated activation of DC and macrophage innate sensors, through accumulated IgG ICs in their surfaces, seems to occur before significant B-cell expansion, interferon- α and B cell-activating factor secretion, and LN progression.¹⁷ For example, RNA sensing by conventional DCs through TLR7 has been reported to be critical to the development of LN.³⁷ C4BP(β -) is able to prevent TLR4- and TLR7-mediated activation of monocyte-derived DCs (reference 13 and data not shown). Accordingly, immunomodulatory C4BP(β -) administration into our NZBW F1 LN model seemed to preclude glomerular and interstitial apoptotic cell accumulation and/or apoptotic debris coating of myeloid cells, either preventing cell dying or increasing their renal clearance.

Strikingly, at the molecular level, a comparative analysis of the transcriptional fingerprints of C4BP(β -), CYP, and the vehicle PBS induced in renal tissue from 36-week-old NZBW F1 mice uncovered the high specificity of C4BP(β -) treatment with respect to the standard CYP regimen. Thus, by setting the fold change threshold to ± 1.8 , only 24 transcripts (6.4% of the SLE genes arrayed) were regulated by C4BP(β -) compared with 224 transcripts (59.4% of the SLE genes arrayed) regulated by CYP, nevertheless both conferring analogous functional improvements in nephritic NZBW F1 kidneys. This points out to increased safety because of a much more focused and specific action of C4BP(β -)-mediated immunomodulation as compared with the known toxicity profile concomitant to CYP global immunosuppression.

The resulting C4BP(β -) transcriptional profile also revealed exclusive downregulation of typical immune cell markers, with a significant reduction of B cell (*Cd19*, *Cd20*, and *BAFFR*), T cell (*Lat*), and neutrophil (*Prtn3*, *S100a8*, and *S100a9*) transcripts identifying inflammatory cell infiltrates in the renal parenchyma, relative to untreated nephritic NZBW F1 kidneys. Of note, the alarmin calprotectin (*S100a8/S100a9*), exclusively downregulated by C4BP(β -) treatment, induces inflammasome activation and IL-1 β -dependent monocytoysis and neutrophilia.³⁸ Concordantly, it has been recently shown that human C4BP inhibits pancreatic islet amyloid polypeptide-induced inflammasome activation.³⁹ Indeed, the reduction/absence of both lymphoid and myeloid cells in C4BP(β -)-treated kidneys was backed by immunohistochemical evaluation and confirms that C4BP(β -) immunomodulation targets cellular effectors responsible for the immune dysregulation driving SLE.⁴⁰ Moreover, experimental and bioinformatics analyses stressed the inhibition of the proinflammatory nuclear factor κ B and interferon (*Irf7*) pathways through C4BP(β -) action, leading to suppression of innate immune responses. Both pathways have deemed essential for autoantibody production and development of nephritis in murine lupus.⁴¹

Chronic unresolved inflammation in LN paves the way for ELS development, a hallmark of tissue autoimmunity, which intends to address the high local concentration of autoantigens, supporting the formation of a network of follicular DCs for antigen presentation surrounded by proliferating/activated B-cell- and T-cell-rich areas, much like secondary lymphoid organs. It has been shown both in the NZBW F1 model and in patients with LN that the chemokine CXCL13 play an important role in the initiation and development of LN^{42,43} and abnormally increased serum CXCL13 levels could

Figure 8 | (continued) vehicle PBS-treated (right) 22-week-old MRL-*lpr* mice stained with hematoxylin and eosin (**d**). The data obtained were used to semiquantitatively grade histopathology traits indicating active lupus nephritis (mesangial expansion, endocapillary proliferation, glomerular deposits, extracapillary proliferation, and interstitial infiltrates) as well as chronic lesions (tubular atrophy and interstitial fibrosis). $n = 3$ mice per group. Clinical features of dermatitis in MRL-*lpr* mice treated with C4BP(β -) (left panels) or PBS (right panels) (**e**). Major lesions were observed around the facial and scapular regions, and vasculitis was evident in the ears of PBS-treated mice. Skin lesion severity score at w19 and w21 for each of the study groups is shown on the right. PBS, $n = 5$; C4BP(β -) and CYP, $n = 6$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with PBS-treated mice. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

induce extensive chemotaxis of CXC chemokine receptor 5-expressing B cells, activated T cells, and DCs into renal LN tissues stimulating inflammatory ELS formation.^{18,44} Conversely, it has been shown that direct CXCL13 blockade disrupts ELS formation⁴⁵ and attenuates LN in MRL-*lpr* mice.⁴⁶ Remarkably, C4BP(β^-) treatment also leads to significant CXCL13 downregulation both systemically and locally in NZBW F1 kidneys. Consequently, the presence of cortical ELS in our C4BP(β^-)-treated aged mice was virtually absent, consistent with substantially reduced inflammatory immune cell infiltrates compared with untreated nephritic aged mice. Follicular DCs have been considered the main producers of CXCL13, although newly recruited monocytes, macrophages, and myeloid DCs have also been shown to secrete CXCL13 in response to activation by TLR2/4 ligands.^{47–51} Thus, C4BP(β^-) action through the inflammatory myeloid cell–CXCL13–ELS axis would prevent ELS neogenesis in chronically inflamed tissues, which has been correlated with allograft rejection and autoimmune disease progression.⁵²

In summary, additional studies will be required to further decipher the molecular mechanism of C4BP(β^-) immunomodulation, leading to improvement in LN pathology. Nevertheless, the relevant efficacy and specificity of C4BP(β^-) in both NZBW F1 and MRL-*lpr* LN mice anticipates promising possibilities to explore novel therapeutic options for SLE patients with LN.

METHODS

Proteins and drugs

Peripheral blood from healthy individuals was supplied by the local blood bank. The C4BP(β^+) heterooligomer was purified from pooled plasma by BaCl_2 precipitation, as previously described.⁵³ C4BP(β^-) was obtained from pooled plasma supernatants after BaCl_2 precipitation and purified according to a protocol setup from Bioingenium (Barcelona, Spain). Their purity was >85%, as assessed by sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and Coomassie Blue staining (Supplementary Figure S6). CYP (Genoxal, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalle, Germany) was resuspended in saline. Further information is given in the Supplementary Methods.

Mice, study design, and follow-up

We used NZBW F1 and MRL-*lpr* female mice⁵⁴ (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (6–8 animals per group), aged 6 months (NZBW F1 mice each weighing 35–40 g) or 2.5 months (MRL-*lpr* mice each weighing 25–30 g), for the studies. C4BP isoforms (C4BP(β^-), recombinant C4BP(β^-), and C4BP(β^+)) were administered i.p. or s.c., as indicated, for 3 months (between 6 and 9 months of age in the case of NZBW F1 mice and between 2.5 and 5.5 months of age in the case of MRL-*lpr* mice) at the specified doses and schedules. CYP was also administered i.p. at 2.5 mg/mouse every 10 days in the same time frames, as previously described.^{55,56} Finally, a control group underwent vehicle PBS administration following the same administration route and schedule as did the C4BP(β^-) group in the different studies (Figures 1a and 8a; Supplementary Figures S3A and S4A). Detailed procedures are given in the Supplementary Methods.

Renal function analysis: proteinuria, albuminuria, and blood urea nitrogen

Twenty-four-hour urinary protein was determined by the pyrogallol red–molybdate protein–dye binding method (Olympum Autoanalyzer AU400, Hamburg, Germany), while 24-hour urinary albumin was determined using a commercially available ELISA kit (Active Motif, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Levels of blood urea nitrogen in the sera from NZBW F1 mice were measured using a commercially available enzymatic kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the manufacturer's recommendations.

Assessment of anti-dsDNA antibodies

Levels of anti-dsDNA antibodies (IgG + IgA + IgM) were measured using a commercially available ELISA kit (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) according to the manufacturer's recommendations.

Renal histopathology

Coronal kidney slices (1–2 mm thick) were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. For light microscopy, 5- μm -thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed with a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon Instruments, Amstelveen, The Netherlands). Glomerular cross-sectional area (in micrometer squared) was calculated on the basis of a mean area of 150 glomeruli in each group. Details are given in the Supplementary Methods.

Immunofluorescent determination of renal IC and complement deposition

For analysis of IgG and C3 deposition, fluorescent staining of kidney cryosections was performed. Sections were directly stained with fluorescein isothiocyanate–conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich), and fluorescein isothiocyanate–conjugated C3 (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands). At least 10 glomeruli per section were visualized. For detailed analyses, see the Supplementary Methods.

Complement activity assay

Activity of the classical complement pathway in fresh sera was determined by C3b deposition on K562 cells opsonized with rabbit polyclonal antibodies (Agrisera, Vännäs, Sweden), as previously described,²⁰ and quantified using fluorescein isothiocyanate–conjugated goat IgG fraction to mouse complement C3 antibody (MP Biomedicals, Solon, OH) and flow cytometry. Heat-inactivated serum samples (56 °C, 30 minutes) were used as negative controls. A further description is given in the Supplementary Methods.

Immunohistochemistry

The following primary antibodies were used: polyclonal rabbit anti-mouse CD11c (1:200, Biorbyt, BioNova, Cambridge, UK), polyclonal rabbit anti-mouse Lat (1:50, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), monoclonal rat anti-mouse Gr1 (1:50, R&D Systems, Minneapolis, MN), monoclonal rat anti-mouse F4/80 (1:50, Thermo Fisher Scientific), and monoclonal rat anti-mouse CD19 (1:200, Thermo Fisher Scientific). F4/80 marker detection required antigen retrieval using proteinase K. After washing with PBS, slices were incubated with the appropriate secondary antibody—biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200, Vector Laboratories, Peterborough, UK) or ImmPRESS-HRP anti-rat IgG (mouse adsorbed) polymer detection kit (Vector Laboratories)—for 1 hour at room temperature.

Regarding CD11c and Lat markers, the standard Vectastain (ABC) avidin-biotin peroxidase complex (Vector Laboratories) was applied. For further details about tissue processing and staining, see [Supplementary Methods](#).

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling assay

Apoptosis detection was performed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling using the TACS TdT In Situ Apoptosis Detection Kit - DAB (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Details are given in the [Supplementary Methods](#).

Differential gene expression analysis

Total RNA from mouse kidneys was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Gene expression profiling was performed by interrogating reverse transcribed pooled cDNA (2–3 animals per group) using Custom TaqMan Low Density Array Cards (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) ([Supplementary Table S1](#)) run on the 7900HT system for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis according to the manufacturer's instructions. Differentially expressed genes were analyzed using the Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, QIAGEN) to identify biological and molecular networks differentially regulated in the LN model. Selected gene transcripts were further validated in individual mouse kidney samples by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Pathway annotation of the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction-validated gene set was performed through PathwayAX.⁵⁷ Detailed procedures are given in the [Supplementary Methods](#).

Mouse cytokine array

Sera and renal lysates were analyzed using the Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Panel A kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Further details are given in the [Supplementary Methods](#).

CXCL13 ELISA

CXCL13 cytokine levels from both sera and tissue lysates were quantified using the LEGEND MAX Mouse CXCL13 (BLC) ELISA kit (BioLegend, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Statistical analyses and scientific graphing were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Two-way analysis of variance, corrected for multiple comparisons using the Holm-Sidak method, was performed to analyze proteinuria, albuminuria, blood urea nitrogen, anti-dsDNA antibodies, complement activity, and dermatitis scores throughout the follow-up studies. One-way analysis of variance, corrected for multiple comparisons using the Dunnett method, was used to assess histologic data and CXCL13 cytokine levels. Kaplan-Meier curves along with the log-rank (Mantel-Cox) test were used to assess the differences in survival distributions. Vehicle PBS-treated mice were assigned as the reference group unless otherwise indicated. Relative gene expression levels between the C4BP(β -) and CYP-treatment groups relative to the vehicle PBS-treated group in the validation step were analyzed using the 1-sample *t* test. The Friedman test, corrected using the Dunn *post hoc* analysis method, was applied to compare flow cytometry (mean fluorescence intensity) data. Unless otherwise

stated, data are expressed as mean \pm SD. In all cases, a *P* value of $<.05$ was considered significant.

DISCLOSURE

JMA is a coinventor on pending or issued patents involving compounds and methods for immunomodulation. All the other authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nuria Lluch and Jordi Ortiz (Spherium Biomed S.L) for fruitful discussions and contribution to the research. This work was supported by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Madrid, Spain) (grants FIS-ISCI P116/00377 and P113/00969, cofunded by FEDER funds/European Regional Development Fund—a way to build Europe), the Generalitat de Catalunya (grant 2017SGR291 and Centres de Recerca de Catalunya [CERCA] Program), and Spherium Biomed S.L. JMA and SRdC are members of the Red de Excelencia “Complemento en salud y enfermedad” (SAF2016-81876-REDT). SRdC is supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER (SAF2015-66287-R) and the Autonomous Region of Madrid (S2017/BMD-3673). JMA is sponsored by the Researchers Consolidation Program from the SNS-Dpt. Salut Generalitat de Catalunya (Exp. CES06/012).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Human C4BP(β -) downregulates CD80 and CD86 costimulatory molecules in mouse BMDCs stimulated through the TLR7 agonist gardiquimod. Mouse BMDCs, generated as described in [Supplementary Methods](#), were cultured throughout their differentiation and maturation process with 5 μ g/ml of human C4BP(β -). BMDC maturation was achieved by gardiquimod treatment (10 μ g/ml). Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of CD80 and CD86 surface markers. **(A)** Histograms from one representative experiment are shown. The MFIs for the cell surface markers are indicated in each histogram. **(B)** MFI for CD80 and CD86 cell surface markers. iDC, untreated, immature BMDCs; mDC, untreated, gardiquimod-matured BMDCs; C4BP(β -), C4BP(β -)-treated, gardiquimod-matured BMDCs. The results shown are the median \pm IQR from 3 independent experiments ($*P < 0.05$ compared to mDC).

Figure S2. Time course of anti-human C4BP(β -) antibody development in lupus-prone NZBW F1 mice. Serum levels of anti-human C4BP(β -) antibody production were measured by ELISA from week 20 (pretreatment) to week 36. The anti-human C4BP(β -) antibody titer increased progressively with the time in the C4BP(β -)-treated mice. Cyclophosphamide (CYP), used as a negative control group, did not develop anti-human C4BP(β -)-specific antibodies at any time of the study period. Data are expressed as mean O.D. (450 nm) \pm SD ($n = 6$ mice per group). $****P < 0.0001$ compared with CYP-treated mice.

Figure S3. Renal function determination in lupus-prone NZBW F1 mice after s.c. administration of low-dose rC4BP(β -). **(A)** Schematic dosage for subcutaneous (s.c.) injection of C4BP(β -) and vehicle (PBS) (blue arrows) and cyclophosphamide (CYP) (red arrows) in NZBW F1 mice. **(B)** Unless otherwise indicated, proteinuria was monitored monthly over the course of the assay until week 37. Total 24-hour urinary protein was determined by Pyrogallol Red-molybdate protein dye-binding assay. Data are normalized by mouse weight and expressed as mean values \pm SD ($n = 6$ mice per group); $*P < 0.05$; $***P < 0.001$; $****P < 0.0001$ compared with control, PBS-treated mice. **(C)** Time-course of anti-human rC4BP(β -) antibody development from rC4BP(β -)-treated NZBWF1 mice. Serum levels of anti-human rC4BP(β -) antibody production were measured by ELISA

from week 21 (pretreatment) to week 37. The anti-human rC4BP(β^-) antibody titer increased progressively with the time in the rC4BP(β^-)-treated mice. Cyclophosphamide (CYP), used as a negative control group, did not develop anti-human rC4BP(β^-)-specific antibodies at any time of the study period. Data are expressed as mean O.D. (450 nm) \pm SD (n = 6 mice per group). ****P < 0.0001 compared with CYP-treated mice. (D) Kaplan-Meier survival curves from lupus-prone NZBWF1 mice. Cumulative survival curves showed 100% survival in the CYP-treated mice (6/6), and 67% survival (4/6) in C4BP(β^-)-treated mice at the end of the study (day 337), while all vehicle PBS-treated mice died by day 313 (0/6). Red arrows identify the start (day 168) and the end (day 252) of the treatment period (n = 6 mice per group); *P < 0.05; ****P < 0.0001, compared with vehicle PBS-treated mice; long-rank test.

Figure S4. Comparative LN pathology determination in lupus-prone NZBW F1 mice after the administration of both C4BP isoforms: C4BP(β^+) and C4BP(β^-). (A) Schematic dosage for i.p. injection of C4BP(β^+), C4BP(β^-), and vehicle (PBS) (blue arrows) in NZBW F1 mice. (B) Proteinuria was monitored monthly over the course of the assay from week 21 until week 35. Total 24-hour urinary protein was determined by Pyrogallol Red-molybdate protein dye-binding assay. Data are normalized by mouse weight and are expressed as cumulative mean values (n = 8 mice per group); *P < 0.05 compared with C4BP(β^+)-treated and control, PBS-treated mice. (C) Blood urea nitrogen (BUN) levels were assessed by a coupled enzyme reaction both before (week 21) and during (weeks 29 and 33) C4BP treatment. Data are expressed as mean \pm SD (n = 4 mice per group); *P < 0.05; **P < 0.01, compared with C4BP(β^+)-treated mice (w33). (D) Serum levels of anti-dsDNA antibodies correlating with disease activity were measured by ELISA 1 week and 5 weeks after the start of the treatment (weeks 25 and 29). Data are expressed as mean \pm SD (n = 3 mice per group); *P < 0.05 compared with C4BP(β^+)-treated mice (w25); *P < 0.05 compared with vehicle PBS-treated mice (w29). (E) Kaplan-Meier survival curves from lupus-prone NZBW F1 mice. Cumulative survival curves showed 100% survival (8/8) in the C4BP(β^-)-treated mice, 75% survival (6/8) in PBS-treated mice, and 62.5% survival (5/8) in C4BP(β^+)-treated mice at the end of the study (day 252). Red arrows identify the start (day 168) and the end (day 252) of the treatment period (n = 8 mice per group; *P = 0.06), compared with C4BP(β^+)-treated mice; long-rank test. (F) Representative sections of renal cortex from 36-week old mice treated with C4BP(β^+) (left), C4BP(β^-) (center), and vehicle PBS (right) mice stained with hematoxylin and eosin. The data obtained were used to semiquantitatively grade histopathology traits indicating active lupus nephritis (mesangial expansion, endocapillary proliferation, glomerular deposits, extracapillary proliferation, and interstitial infiltrates), as well as chronic lesions (tubular atrophy and interstitial fibrosis) (n = 3 mice per group).

Figure S5. Effect of C4BP(β^+) and C4BP(β^-) treatment on the activity of the classical pathway of complement from NZBW F1 mouse sera. The activity of the classical pathway of complement was measured as the deposition of C3b on antibody-opsonized K562 cells and incubated with mouse sera for 30 minutes at 37 °C. Deposited C3b was detected using a FITC-labelled antibody and flow cytometry. MFI, median fluorescence intensity. Complement activity levels of NZW F1 mice analyzed before the start of C4BP treatment (week 21; n = 6 mice per group) and throughout the treatment (weeks 25 [n = 6 mice per group], 29 and 33 [n = 3 mice per group]). Data are expressed as mean \pm SD. *P < 0.05 compared with both C4BP(β^+)-treated and PBS-treated mice. Serum from C57BL6 mice (14-week old; n = 4) was included as a reference control for normal complement activity. Negative controls (Inact.) from all analyzed samples were determined after serum inactivation at 56 °C for 30 minutes.

Figure S6. Electrophoretic analysis of plasma-purified human C4BP(β^+) and C4BP(β^-) isoforms. Both plasma-purified human C4BP(β^+) and C4BP(β^-) underwent 3%–8% gradient SDS-PAGE under nonreducing (NR) and reducing (R) conditions. Under NR conditions, C4BP(β^-) is a homooligomer composed of 7 identical α -chains, and C4BP(β^+) is a heterooligomer composed of 7 identical α -chains and a unique β -chain. All chains are covalently linked by their C-termini forming a spider-like structure in both isoforms, which migrate as a 500–570 kDa band (upper arrow). The β -chain is always in complex with the vitamin K-dependent anticoagulant PS (70 kDa). Thus, under reducing conditions, the diffuse 70 kDa band (lower arrow) corresponds to the disassembled α -chains in the case of the C4BP(β^-) isoform, and to the disassembled PS plus the α -chains in the case of the C4BP(β^+) isoform. MW marker, molecular weight marker.

Table S1. List of relevant SLE genes included in the customized TaqMan low density array.

Table S2. List of genes induced by C4BP(β^-) treatment (FC \geq 1.8).

Table S3. List of genes induced by CYP treatment (FC \geq 1.8).

Table S4. Relevant enriched biological functions (IPA) associated with differentially expressed renal genes from C4BP(β^-)-treated NZBW F1 mice.

Supplementary Methods.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.kidney-international.org.

REFERENCES

- Maroz N, Segal MS. Lupus nephritis and end-stage kidney disease. *Am J Med Sci.* 2013;346:319–323.
- Monteith AJ, Kang S, Scott E, et al. Defects in lysosomal maturation facilitate the activation of innate sensors in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E2142–E2151.
- Kang S, Fedorow Y, Brennen EK, et al. BAFF induces tertiary lymphoid structures and positions T cells within the glomeruli during lupus nephritis. *J Immunol.* 2017;198:2602–2611.
- Das A, Heesters BA, Bialas A, et al. Follicular dendritic cell activation by TLR ligands promotes autoreactive B cell responses. *Immunity.* 2017;46:106–119.
- Krieg AM. The toll of too much TLR7. *Immunity.* 2007;27:695–697.
- Chang A, Henderson SG, Brandt D, et al. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol.* 2011;186:1849–1860.
- Venuturupalli S. Rethinking biologics in lupus nephritis. *Lupus.* 2016;25:1102–1110.
- Sánchez-Corral P, Criado García O, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. I. Molecular basis for the C4BP isoform pattern and its variations in human plasma. *J Immunol.* 1995;155:4030–4036.
- Criado García O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J Immunol.* 1995;155:4037–4043.
- Blom AM. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:978–982.
- Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost.* 1991;66:49–61.
- Kask L, Trouw LA, Dahlbäck B, et al. The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2004;279:23869–23873.
- Olivar R, Luque A, Naranjo-Gómez M, et al. The $\alpha 7\beta 0$ isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J Immunol.* 2013;190:2857–2872.
- Wu Y, Tang W, Zuo J. Toll-like receptors: potential targets for lupus treatment. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36:1395–1407.
- Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin Ther.* 2002;24:1720–1740.
- Sugisaki T, Takase S. Composition of immune deposits present in glomeruli of NZB/W F1 mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991;61:296–308.

17. Kang S, Rogers JL, Monteith AJ, et al. Apoptotic debris accumulates on hematopoietic cells and promotes disease in murine and human systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2016;196:4030–4039.
18. Ishikawa S, Sato T, Abe M, et al. Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J Exp Med.* 2001;193:1393–1402.
19. Fritchen C, Kim HJ, Lightfoot RW. Studies of murine complement: correlation of hypocomplementemia with other disease parameters in individual NZB/W mice and demonstration of anti-complementary material. *Arthritis Rheum.* 1980;23:904–910.
20. Blom AM, Nandakumar KS, Holmdahl R. C4b-binding protein (C4BP) inhibits development of experimental arthritis in mice. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:136–142.
21. Wang Y, Hu Q, Madri JA, et al. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:8563–8568.
22. Bao L, Osawe I, Haas M, et al. Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis. *J Immunol.* 2005;175:1947–1955.
23. Bao L, Osawe I, Puri T, et al. C5a promotes development of experimental lupus nephritis which can be blocked with a specific receptor antagonist. *Eur J Immunol.* 2005;35:2496–2506.
24. Song H, He C, Knaak C, et al. Complement receptor 2-mediated targeting of complement inhibitors to sites of complement activation. *J Clin Invest.* 2003;111:1875–1885.
25. Bao L, Haas M, Kraus DM, et al. Administration of a soluble recombinant complement C3 inhibitor protects against renal disease in MRL/lpr mice. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:670–679.
26. Sekine H, Kinser TTH, Qiao F, et al. The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1076–1085.
27. Jacob CO, Pricop L, Putterman C, et al. Paucity of clinical disease despite serological autoimmunity and kidney pathology in lupus-prone New Zealand mixed 2328 mice deficient in BAFF. *J Immunol.* 2006;177:2671–2680.
28. Ramanujam M, Wang X, Huang W, et al. Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J Clin Invest.* 2006;116:724–734.
29. Bergtold A, Gavhane A, D'Agati V, et al. FcR-bearing myeloid cells are responsible for triggering murine lupus nephritis. *J Immunol.* 2006;177:7287–7295.
30. Zampelli E, Klinman DM, Gershwin ME, et al. A comprehensive evaluation for the treatment of lupus nephritis. *J Autoimmun.* 2017;78:1–10.
31. de Córdoba SR, Pérez-Blas M, Ramos-Ruiz R, et al. The gene coding for the β -chain of C4b-binding protein (C4BPB) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics.* 1994;21:501–509.
32. Kristensen T, Ogata RT, Chung LP, et al. cDNA structure of murine C4b-binding protein, a regulatory component of the serum complement system. *Biochemistry.* 1987;26:4668–4674.
33. Wenderfer SE, Soimo K, Wetsel RA, et al. Analysis of C4 and the C4 binding protein in the MRL/lpr mouse. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:R114.
34. Olivar R, Luque A, Cárdenas-Brito S, et al. The complement inhibitor factor H generates an anti-inflammatory and tolerogenic state in monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2016;196:4274–4290.
35. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol.* 2018;19:108–119.
36. Sendo S, Saegusa J, Morinobu A. Myeloid-derived suppressor cells in non-neoplastic inflamed organs. *Inflamm Regen.* 2018;38:19.
37. Celhar T, Hopkins R, Thornhill SJ, et al. RNA sensing by conventional dendritic cells is central to the development of lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E6195–E6204.
38. Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab.* 2014;19:821–835.
39. Kulak K, Westermark GT, Papac-Milicevic N, et al. The human serum protein C4b-binding protein inhibits pancreatic IAPP-induced inflammasome activation. *Diabetologia.* 2017;60:1522–1533.
40. Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective. *Trends Mol Med.* 2017;23:615–635.
41. Miyagawa F, Tagaya Y, Ozato K, et al. Essential requirement for IFN regulatory factor 7 in autoantibody production but not development of nephritis in murine lupus. *J Immunol.* 2016;197:2167–2176.
42. Schiffer L, Bethunaikan R, Ramanujam M, et al. Activated renal macrophages are markers of disease onset and disease remission in lupus nephritis. *J Immunol.* 2008;180:1938–1947.
43. Sang A, Zheng Y-Y, Morel L. Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Mol Immunol.* 2014;62:329–338.
44. He DN, Chen WL, Long KX, et al. Association of serum CXCL13 with intrarenal ectopic lymphoid tissue formation in lupus nephritis. *J Immunol Res.* 2016;2016:4832543.
45. Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, et al. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. *Mucosal Immunol.* 2014;7:1244–1254.
46. Wu X, Guo J, Ding R, et al. CXCL13 blockade attenuates lupus nephritis of MRL/lpr mice. *Acta Histochem.* 2015;117:732–737.
47. Carlsen HS, Baekkevold ES, Morton HC, et al. Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood.* 2004;104:3021–3027.
48. Vermi W, Facchetti F, Riboldi E, et al. Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of *Bartonella henselae* B-rich granuloma. *Blood.* 2006;107:454–462.
49. Rupprecht TA, Kirschning CJ, Popp B, et al. *Borrelia garinii* induces CXCL13 production in human monocytes through Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2007;75:4351–4356.
50. Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, et al. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J Clin Invest.* 2010;120:4251–4272.
51. Cohen SB, Smith NL, McDougal C, et al. β -Catenin signaling drives differentiation and proinflammatory function of IRF8-dependent dendritic cells. *J Immunol.* 2015;194:210–222.
52. Neyt K, Perros F, GeurtsvanKessel CH, et al. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2012;33:297–305.
53. Mohlin FC, Blom AM. Purification and functional characterization of C4b-binding protein (C4BP). *Methods Mol Biol.* 2014;1100:169–176.
54. Rottman JB, Willis CR. Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Vet Pathol.* 2010;47:664–676.
55. Alperovich G, Rama I, Lloberas N, et al. New immunosuppressor strategies in the treatment of murine lupus nephritis. *Lupus.* 2007;16:18–24.
56. È Ripoll, Merino A, Goma M, et al. CD40 gene silencing reduces the progression of experimental lupus nephritis modulating local milieu and systemic mechanisms. *PLoS One.* 2013;8:e65068.
57. Ogris C, Helleday T, Sonhammer ELL. PathwayAX: a web server for network crosstalk based pathway annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:W105–W109.



The Hidden Side of Complement Regulator C4BP: Dissection and Evaluation of Its Immunomodulatory Activity

Inmaculada Serrano^{1†}, Ana Luque^{1†}, Francesca Mitjavila², Anna M. Blom³, Santiago Rodríguez de Córdoba⁴, M. Cristina Vega⁵, Joan Torras⁶ and Josep M. Aran^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Kathleen P. Pratt,
Uniformed Services University of the
Health Sciences, United States

Reviewed by:

Brandon L. Garcia,
East Carolina University, United States
Rosanne Spolski,
National Institute of Health (NIH),
United States

*Correspondence:

José M. Aran
jara@idibell.cat

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance
and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 February 2022

Accepted: 28 March 2022

Published: 25 April 2022

Citation:

Serrano I, Luque A, Mitjavila F,
Blom AM, Rodríguez de Córdoba S,
Vega MC, Torras J and Aran JM
(2022) The Hidden Side of
Complement Regulator C4BP:
Dissection and Evaluation of its
Immunomodulatory Activity.
Front. Immunol. 13:883743.
doi: 10.3389/fimmu.2022.883743

¹ Immune-inflammatory Processes and Gene Therapeutics Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ² Internal Medicine Service, Bellvitge University Hospital, University of Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, ³ Department of Translational Medicine, Section of Medical Protein Chemistry, Lund University, Malmö, Sweden, ⁴ Molecular Pathology/Genetics of Complement Group, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC) and Ciber de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain, ⁵ Structural Biology of Host-Pathogen Interactions Group, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Madrid, Spain, ⁶ Nephrology Department, Bellvitge University Hospital, Experimental Nephrology Lab., University of Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

C4b-binding protein (C4BP) is a well-known regulator of the complement system that holds additional and important activities unrelated to complement inhibition. Recently, we have described a novel immunomodulatory activity in the minor C4BP(β -) isoform directly acting over inflammatory phagocytes. Here we show that incorporation of the β -chain to the C4BP α -chain oligomer interferes with this immunomodulatory activity of C4BP. Moreover, an oligomeric form including only the complement control protein 6 (CCP6) domain of the C4BP α -chain (PRP6-HO7) is sufficient to “reprogram” monocyte-derived DCs (Mo-DCs) from a pro-inflammatory and immunogenic phenotype to an anti-inflammatory and tolerogenic state. PRP6-HO7 lacks complement regulatory activity but retains full immunomodulatory activity over inflammatory Mo-DCs induced by TLRs, characterized by downregulation of relevant surface markers such as CD83, HLA-DR, co-stimulatory molecules such as CD86, CD80 and CD40, and pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and TNF- α . Furthermore, PRP6-HO7-treated Mo-DCs shows increased endocytosis, significantly reduced CCR7 expression and CCL21-mediated chemotaxis, and prevents T cell alloproliferation. Finally, PRP6-HO7 shows also full immunomodulatory activity over Mo-DCs isolated from lupus nephritis patients with active disease, even without further pro-inflammatory stimulation. Therefore PRP6-HO7, retaining the immunomodulatory activity of C4BP(β -) and lacking its complement regulatory activity, might represent a promising and novel alternative to treat autoimmune diseases.

Keywords: PRP6-HO7, lupus nephritis, dendritic cells, inflammation, immunomodulation, C4BP(β -)

INTRODUCTION

The complement system is an essential component of innate immunity. This evolutionarily conserved effector system, in addition to its crucial function in the innate defense against common pathogens, also holds a key regulatory and anti-inflammatory role in the “silent” clearance of immune complexes from the circulation and dying cells from damaged tissues, in close crosstalk with the mononuclear phagocyte system (1, 2). The complement cascade is tightly regulated by multiple regulatory proteins, as inappropriate activation is known to result in inflammation and host tissue destruction (3). The major proteins that regulate complement activation, both cell surface and fluid phase inhibitors, belong to the regulators of complement activation (RCA) family, and are exclusively composed of complement control protein (CCP) modules (4).

C4b-binding protein (C4BP) is the primary fluid phase inhibitor of the classical and lectin pathways of complement activation. It is synthesized mainly in the liver and is present in the circulation primarily as a major heterooligomeric isoform composed of seven α -chains and one β -chain termed C4BP (α 7 β 1) or C4BP(β +), and a minor homooligomeric isoform preserving the seven α -chains but lacking the β -chain, dubbed C4BP(α 7 β 0) or C4BP(β -). The α - and β -chains from both C4BP isoforms are held together in their C-terminus through an oligomerization domain which determines the spatial alignment of the chains, forming a spider-like structure. Both chains are, in turn, composed of a linear array of complement control protein (CCP) or “sushi” domains (α -chain (70 kDa): eight CCP domains; β -chain (40 kDa): three CCP domains) (5, 6). The β -chain binds non-covalently yet with high affinity (0.1 nM) to vitamin K-dependent anticoagulant protein S (PS) through its N-terminal CCP1 domain. Thus, under physiologic conditions the major C4BP(β +) isoform is joined to PS as C4BP(β)-PS. This 570 kDa bimolecular complex endows additional roles in coagulation and in apoptotic/necrotic cell binding (7–9). Conversely, C4BP(β -) does not bind PS. Interestingly, under strong pro-inflammatory conditions (e.g., acute phase), the presence of circulating C4BP(β -) isoform increases, inducing a change in the C4BP(β +) : C4BP(β -) ratio from ~ 80:20 to ~ 50:50 (10, 11). Nevertheless, both isoforms are equally competent for complement inhibition, which involves the N-terminal CCP1-CCP3 domains. These N-terminal domains bind several ligands, including the complement proteins C3b and C4b, heparin, pentraxins, CD91, DNA, and surface proteins from several bacterial pathogens (12).

Additionally, we have discovered a novel non-canonical activity in the minor isoform of C4BP, C4BP(β -). CCP domain-deletion mutagenesis in C4BP(β -) has revealed that CCP6 is required for this anti-inflammatory and tolerogenic activity by direct interaction with monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs), an established model of inflammatory DCs (13).

In this report we demonstrate that C4BP(β -), a modular RCA protein in structure, is also provided of functional modularity by displaying a dual activity. Thus, while the CCP1-CCP3 domains are required for the canonical complement inhibitory activity of

C4BP(β -), the CCP6 domain is responsible for its non-canonical anti-inflammatory and tolerogenic activity. In contrast C4BP(β +), even whether devoid of PS, lacks the non-canonical activity. Moreover, we show that the CCP6 domain is not only necessary but also sufficient, whether oligomerized, for the immunomodulatory activity of C4BP(β -). PRP6-HO7, a recombinant heptamer resulting by joining CCP6 and the oligomerization domains of C4BP, lacks the complement inhibitory activity of C4BP while fully preserving its immunomodulatory activity. We recently confirmed the therapeutic potential of the non-canonical activity of C4BP(β -) to limit the development of lupus nephritis (LN) in two different animal models (14). We reveal here that PRP6-HO7 reverses the pro-inflammatory phenotype of monocytes isolated from LN patients, which supports its therapeutic potential in autoimmune pathologies.

MATERIALS AND METHODS

Obtention and Purification of C4BP(β +), C4BP(β -), PRP5/8-HO7, PRP6-HO7 and PRP6-NO

As previously described, the C4BP(β +) and C4BP(β -) isoforms were differentially purified from pooled human plasma supplied by the local blood bank through BaCl₂ precipitation (13). An alternative form of C4BP(β +) devoid of the anticoagulant PS, dubbed “C4BP(β +) naked”, was obtained by dialyzing C4BP(β +) (C4BP(β +)–PS) against 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 80% ethylene glycol plus heparin-sepharose chromatography.

PRP6-HO7 (Proline-rich Protein domain CCP6 heptamerized) is a 100 kDa homooligomer of seven recombinant polypeptides (14.3 kDa/each) engineered by fusing the N-terminal 6xHis-tagged CCP6 domain and the oligomerization domain of the C4BP α -chain. Analogously, in PRP6-NO (Proline-rich Protein domain CCP6 not oligomerized) (12.7 kDa), the C4BP α -chain has been engineered by fusing its N-terminal 6xHis-tagged CCP6 domain and a mutated version of the C4BP oligomerization domain unable to oligomerize by replacement of two cysteine residues by alanine and by deletion of its last 13 C-terminal amino acids (Δ 537-549/C498A/C510A) (15).

The α -chain sequences corresponding to recombinant full-length C4BP(β -) and variants PRP5/8-HO7 (Proline-rich Protein domains CCP5-CCP8 heptamerized), PRP6-HO7, and PRP6-NO were all cloned into the pCDNA3.1(+) expression vector (ThermoFisher, Waltham, MA). Plasmid DNAs were amplified and purified using a Qiafilter Plasmid MegaKit (Qiagen, Hilden, Germany). Expi293 cells (ThermoFisher) were grown in suspension cultures until reaching the desired volume at a cell density of 2.5×10^6 cells/ml and 98% viability. Cells were transiently transfected with 1 mg DNA per liter of culture and incubated for 7 days at 37°C, shaking at 125 rpm, with 8% CO₂ supply. Finally, the culture media was collected and centrifuged for 30 min, 6000g at 4°C. The cell culture supernatants were used for protein purification. Recombinant full-length C4BP(β -) and variant PRP5/8-HO7 purification included four sequential chromatography steps:

heparin chromatography, hydrophobic interaction (butyl) chromatography, anion exchange (Q Sepharose) chromatography and, finally, size exclusion (Superdex) chromatography. PRP6-HO7 and PRP6-NO were purified by nickel affinity chromatography (HisTrap FF) according to standard procedures. All chromatography columns were from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden). The proteins were concentrated, dialyzed, and recovered in PBS buffer, pH 7.4, and their purity was higher than 85%, as assessed by Bis-Tris 4-12% SDS-PAGE (NuPAGE precast protein gels; ThermoFisher) and further Blue Safe staining (NZYTech, Lisboa, Portugal).

PRP6-HO7 Structure Prediction

The homo oligomeric structure of PRP6-HO7 was predicted by comparative protein structure modeling with MODELLER v10.1 (16) using suitable crystallographic structures as multiple templates. The structure of the C4BP α -chain CCP1 and CCP2 domains (PDB 510Q) were used as templates for the N-terminal CCP6 domain of PRP6-HO7 (17) and the C-terminal heptameric core complex structure of C4BP was taken from PDB 4B0F (18). Suitable restraints were introduced to ensure the proper recognition of the two disulphide bonds present in CCP6 (Cys365-Cys409 and Cys399-Cys422), and the heptameric organization of the C-terminal helical motif was stabilized through symmetry restraints. One thousand models were calculated for the target sequence and the model with the lowest value for the DOPE assessment score was selected as the best model (19). The stereochemical quality of the selected model was further evaluated with MolProbity (20).

Monocyte Culture and C4BP-Derived Protein Treatment

Total blood from healthy donors was acquired in the Blood and Tissue Bank (Barcelona, Spain) and their PBMCs were isolated at less than 16 h after extraction through Ficoll-Paque density centrifugation (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

Systemic lupus erythematosus (SLE) patients derived to the Nephrology and Internal Medicine Units (UFMAS) from Bellvitge University Hospital underwent blood extraction at hospital admission, and their PBMCs were obtained as described for healthy donors. This study was approved by the IDIBELL's ethics committee in accordance with institutional guidelines and the Declaration of Helsinki, and the patients' written informed consent was obtained.

For all functional assays, monocytes were purified using colloidal super-paramagnetic microbeads conjugated with monoclonal mouse anti-human CD14 antibodies (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and counted using Perfect Count microspheres (Cytognos SL, Salamanca, Spain). In addition, the purity of CD14⁺ cells was tested by CD14 staining and flow cytometry analysis (FACSCanto II flow cytometer equipped with FACSDiva software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)), allowing the assessment of the number of PBMCs and the number of total CD14⁺ cells (>90% CD14⁺).

Monocytes were plated at 2.5×10^5 cells/500 μ l in 24 well culture plates (Jet Biofil, Guangzhou, China), in RPMI 1640 (Gibco, ThermoFisher) supplemented with 100 mg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, 2 mM L-glutamine (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) and 10% heat-inactivated FBS (Life technologies, ThermoFisher) (complete medium) at 37 °C under 5% CO₂. Monocyte-derived DCs (Mo-DCs) or monocyte-derived macrophages (Mo-macrophages) were generated supplementing the monocyte cultures with complete RPMI 1640 medium plus GM-CSF (800 IU/ml) and IL-4 (500 IU/ml) (Mo-DCs) or GM-CSF (650 IU/ml) (Mo-macrophages) both from Gentaur, Kampenhout, Belgium.

C4BP(β +), C4BP(β -), and PRP variants were added at day 0 to differentiating monocytes at the indicated concentrations. For DC maturation, Mo-DCs, either untreated or treated with these C4BP-derived molecules, were further stimulated for 48 h with 5 μ g/ml LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) or 10 μ g/ml Gardiquimod (Imidazoquinoline compound; TLR7 ligand) (Invivogen, San Diego, CA) at day 5.

Moreover, to assess the influence of human serum in C4BP (β -) and PRP6-HO7 immunomodulatory activity, human Mo-DCs were treated with the respective PRP variants at the indicated concentrations and co-incubated with 50% of heat-inactivated human serum (56°C, 1h) through their differentiation and maturation process.

TLR Activation

Maturation of Mo-DCs was induced by 48 h incubation with a panel of TLR agonists: Pam3CSK4 (TLR1/2) (300 ng/ml), HKLM (Heat-killed *Listeria monocytogenes*) (TLR2) (10^8 cells/ml), Poly HMW (I:C) and Poly LMW (I:C) (TLR3) (10 μ g/ml/each), LPS-EK (LPS *E.coli* K12) (TLR4) (5 μ g/ml), FLA-ST (Flagellin *S. typhimurium*) (TLR5) (2 μ g/ml), FSL1 (TLR6/2) (100 ng/ml), Gardiquimod (TLR7) (10 μ g/ml), ssRNA40/LyoVec (TLR8) (5 μ g/ml), *E. coli* ssDNA/LyoVec (TLR9) (10 μ g/ml) (all from Invivogen).

Abs and Flow Cytometry

Cell-surface phenotypes were analyzed using the following MoAbs: APC-conjugated anti-CD64 (10.1.1), FITC-conjugated anti-CD14 (TÜK4), PE-conjugated anti-CD40 (HB14), PE-conjugated anti-CD86 (FM95), FITC-conjugated HLA-DR (REA805), APC-conjugated anti-CD83 (REA714), PE-conjugated anti-CD80 (REA661) (Miltenyi Biotec), FITC-conjugated anti-CD3 (UCHT1) (Tonbo Biosciences, San Diego, CA) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-CCR7 (G043H7) (Biolegend, San Diego, CA). APC-conjugated anti-IgG1 (IS5-21F5), FITC-conjugated anti-IgG2a (S43.10), PE-conjugated anti-IgG1 (IS5-21F5), REA control antibody (S) human IgG1 (Miltenyi Biotec), FITC-conjugated anti-IgG1 κ (MOPC-21) (Tonbo Biosciences), and Alexa Fluor 488-conjugated anti-IgG2 κ (MOPC-173) (Biolegend) were used as the respective isotype controls.

After washing with PBS, cells were subsequently stained with the respective MoAbs, according to the manufacturer's

instructions, in 100 ml FACS buffer (PBS containing 1% BSA and 0.1% sodium azide) for 15 min at room temperature. We gated the cells according to forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters to exclude debris. Staining with 7-aminoactinomycin D (ThermoFisher) was also employed to assess their viability status. Stained cells were analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson). Subsequent analyses used FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR).

Endocytic Activity

To measure endocytosis of Mo-DCs, 2×10^5 cells/ml were resuspended in 60 μ l of complete medium and incubated with 4 μ l of BODIPY FL-conjugated DQ-Ovalbumin (1 mg/ml, DQ-OVA, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) at 37°C or at 0°C for 30 min (receptor-dependent endocytosis). The incubations were stopped by adding 150 μ l of cold FACS buffer. The cells were washed two times with cold FACS buffer, and their fluorescence was analyzed using flow cytometry.

Chemotaxis

Mo-DCs differentiated in presence of C4BP(β +), C4BP(β -), or PRP6-HO7, and matured (LPS for 48 h), were tested for migration toward the CCL21 chemokine using transwell assays. Briefly, the lower chambers of transwell plates (polycarbonate filters of 8.0 μ m pore size; Costar, Corning, NY) were filled with 400 μ l of complete RPMI 1640 medium with or without CCL21 (200 ng/ml). A total of 1.6×10^4 DCs in 100 μ l of complete RPMI 1640 medium were added into the upper chamber, and cells were incubated at 37°C for 2 h. Cells migrated into the lower chambers were harvested and counted with a flow cytometer, acquiring events for a fixed time period of 1.5 min. The migration assays for all stimulation conditions were performed in duplicate wells. Values are given as total number of migrated cells.

Mixed Leukocyte Reaction

For the co-culture assays, CD3⁺ T cells were isolated from PBMCs by negative selection using MojoSort™ Human CD3 T Cell Isolation Kit (Biolegend). CD3⁺ T cells were 90% pure, as assessed by CD3 staining and flow cytometry. Allogeneic CD3⁺ T cells were labeled with the intracellular fluorescent dye CFSE (CellTrace™) (Invitrogen, ThermoFisher) according to the manufacturer's recommendations, cultured in 96-well round-bottom plates in RPMI complete medium at a density of 1×10^5 cells/well, and stimulated for 5 days with C4BP(β +), C4BP(β -) or PRP6-HO7-treated and LPS-activated DCs at 1:5 DC:T cell ratio. CD3⁺ T cell proliferation was determined by sequential loss of CFSE fluorescence and quantified by flow cytometry.

Intracellular Cytokine Staining

Total cells from the co-culture assays were stimulated with 50 ng/ml PMA plus 500 ng/ml ionomycin for 5 h in the presence of 10 μ g/ml brefeldin A (all from Sigma Aldrich). After stimulation, cells were washed with PBS, fixed and permeabilized using an IntraStain kit (Dako, Agilent, Santa Clara, CA), and incubated for 30 min at room temperature with APC-conjugated anti-human IFN- γ MoAb (45–15) (Miltenyi). Finally, cells were washed and analyzed by flow cytometry.

DC Cytokine Secretion

Concentrations of human IL-12p70, TNF- α , and IL-10 were determined from DC supernatants treated with the C4BP isoforms or PRP-based proteins using the respective DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

SDS-PAGE and Western Blot Analysis

C4BP isoforms and PRP variants were resolved on 4–12% gradient SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris 4–12% Mini Gels, Invitrogen) under reducing or non-reducing conditions, and either immersed in Blue Safe (NZYTech) for 15 min and destained in water or transferred to a PVDF membrane for Western blot analysis. After blocking, the membrane was probed overnight at 4°C with primary antibodies: 1:2000 dil. polyclonal PK9008 rabbit anti-C4BP α -chain (8) and 1:4000 dil. monoclonal anti-6xHis tag antibody (Takara Bio, Mountain View, CA), and for 1 h at room temp for 1:1000 dil. monoclonal anti-human Protein S/PROS1 antibody (R&D Systems), followed by the addition of 1:2000 dil. polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG HRP (P0448), and 1:2000 dil. polyclonal Goat Anti-Mouse IgG HRP (P0447) (both from Dako), respectively, for 1 h at room temp. Detection was performed with enhanced chemiluminescence (ECL) (Pierce, ThermoFisher) using ChemiDoc Imager (Bio-Rad, Hercules, CA).

C4b Cofactor Activity Assay

Complement C4b (8.9 μ g/ml) and factor I (4.4 μ g/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) were mixed with C4BP isoforms (0.6 nM or 6 nM) in low-salt buffer (25 mM phosphate buffer pH 7.4 and 25 mM NaCl) in a total volume of 60 μ l and incubated at 37°C for 30 min. Then, reducing SDS sample buffer was added, C4b fragments were separated on a 4–12% gradient SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris 4–12% Mini Gels, ThermoFisher), and Western blot analysis of C4b fragments was performed using a 1:2000 dilution of Anti-Human C4d MoAb (Quidel, San Diego, CA) overnight at 4°C, followed by a 1:2000 dilution of polyclonal Goat Anti-Mouse IgG HRP (P0447, Dako) in TBS-Tween 0.05%, 1% BSA, 0.02% Na₂S₂O₃.

Statistical Analysis

Statistical analyses and scientific graphing were performed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA). Repeated measures one-way ANOVA, corrected for multiple comparisons using Dunnett's method was performed to contrast MFI, percentages of CFSE negative, and IFN- γ positive, T cells, and cytokine levels under different experimental conditions with respect to a reference condition. Results from migration assays with or without CCL21 were compared with two-way ANOVA and Dunnett's test. To compare MFI and % of positive cells between two different conditions, the paired t-test was employed. The relationship between the clinical features and the Mo-DC and Mo-macrophage surface marker expression in SLE patients was assessed by Spearman's rank correlation test. Data are expressed as mean values \pm SD. In all cases, a P-value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

The β -Chain Interferes With the Immunomodulatory Activity of C4BP

Among the main human C4BP isoforms only the minor C4BP (β -), but not the major C4BP(β +), displayed non-canonical anti-inflammatory and tolerogenic activity over Mo-DCs (13). Under physiological conditions, all β -chain-containing C4BP molecules in plasma are tightly bound to PS in a 1:1 stoichiometry (21, 22). Thus, the plasma-purified C4BP(β +) isoform is actually present as a high-affinity noncovalent C4BP(β +)–PS complex. While this complex does not interfere with the complement inhibitory activity of C4BP, held through the peripheral N-terminal CCP1–CCP3 domains of its α -chains, it does so for the non-canonical activity recognized in the CCP6 internal domain of its α -chains. Thus to assess which polypeptide, PS or the C4BP β -chain, was responsible for blocking the immunomodulatory activity in C4BP(β +), we excised PS from the purified C4BP (β +)–PS complex (23) and compared the functional

consequences of incubating “C4BP(β +)–PS” and “C4BP(β +) naked” on Mo-DC differentiation/maturation. This particular assay was performed under serum-free conditions to avoid the recruitment of bovine PS by human “C4BP(β +) naked” because it has been shown that the human C4BP/bovine PS interaction has a 5-fold higher affinity than the human C4BP/human PS interaction (24). Western analysis confirmed that the purified “C4BP(β +) naked” isoform was indeed devoid of PS (Figure 1A). In contrast to C4BP(β -), neither “C4BP(β +)–PS” nor “C4BP(β +) naked” were able to significantly influence the overexpression of several LPS-induced Mo-DC activation markers, including the maturation marker CD83 and the co-stimulatory molecules CD86, CD80 and CD40 (Figure 1B). Analogously, only C4BP (β -), but not “C4BP(β +)–PS” or “C4BP(β +) naked”, was able to prevent the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF- α and, conversely, increased the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 1C).

Taken together, these results demonstrate that incorporating the β -chain to the C4BP α -chain oligomer is responsible for the

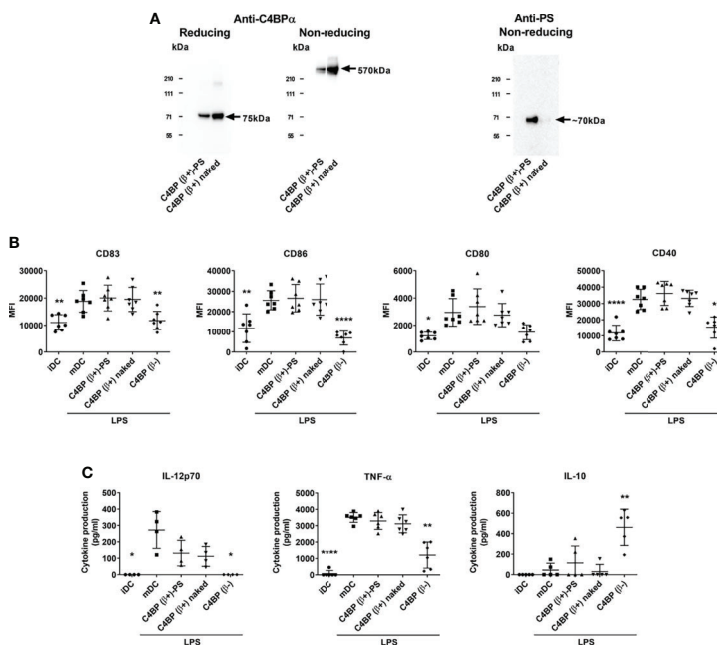


FIGURE 1 | The β -chain of C4BP impairs the immunomodulatory activity of its internal CCP6 α -chain domain. **(A)** SDS-PAGE and Western analysis of the major physiological C4BP isoform (C4BP(β +)–PS) complexed with PS (C4BP(β +)–PS) through its β -chain, and the same C4BP(β +) isoform devoid of PS (C4BP(β +) naked). Both proteins were resolved under reducing (left) and non-reducing (middle) conditions and probed with PK9008 anti-C4BP α -chain antibody. A further Western blot probed with an anti-PS antibody confirmed the absence of PS in the “C4BP(β +) naked” form (right). **(B)** Human Mo-DCs were incubated throughout their differentiation process with C4BP(β +)–PS, C4BP(β +) naked and C4BP(β -), all at 12 nM (corresponding to 6.0 μ g/ml, 5.3 μ g/ml, and 5.0 μ g/ml, respectively). DC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of the activation marker CD83 and the co-stimulatory molecules CD86, CD80 and CD40. MFI, median fluorescence intensity for the different surface markers. **(C)** The concentrations of IL-12p70, TNF- α and IL-10 were analyzed in the respective cell supernatants by ELISA. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, LPS-matured DCs. The results shown are the mean \pm SD from 7 independent donors (cell surface markers), or from 4–6 independent donors performed in duplicate (cytokines) (* p < 0.05; ** p < 0.01; **** p < 0.0001 compared with mDC). IL-12p70 concentrations induced by C4BP(β +)–PS and C4BP(β +) naked appeared reduced but were not statistically significant compared to that induced by mDC (p = 0.082, and p = 0.053, respectively).

absence of immunomodulatory activity of the major C4BP(β^+) isoform, and that this effect of the β -chain does not require the incorporation of the PS to the complex.

C4BP Modularity Allows Dissection of Its Immunomodulatory Activity

We sought to dissect the non-canonical immunomodulatory activity of C4BP(β^-) from its canonical complement regulatory activity to confirm its functional independence. Thus, we designed and recombinantly produced two novel C4BP variants: PRP5/8-HO7 and PRP6-HO7, both lacking the three outermost CCP1-CCP3 domains required for complement inhibition (25). Thus, variant PRP5/8-HO7 is an heptamer containing a truncated version (CCP5-CCP8 plus C-terminal oligomerization domain) of the C4BP α -chain, and variant PRP6-HO7 is an heptamer including only the CCP6 domain and the C-terminal oligomerization domain of the C4BP α -chain (Figure 2A). In PRP5/8-HO7, only the CCP1-CCP4 N-terminal domains of the C4BP α -chain were deleted to prevent potential misfolding issues around CCP6 that could affect its immunomodulatory activity.

To comparatively assess the immunomodulatory activity of the full-length recombinant C4BP(β^-) isoform and its deletion variants PRP5/8-HO7 and PRP6-HO7, we pre-incubated Mo-DCs with the indicated concentrations of each protein or the inactive C4BP(β^+) isoform and further challenged these cells with the pro-

inflammatory and maturation stimulus LPS. As previously published (13), recombinant C4BP(β^-), but not C4BP(β^+), was able to confer a semi-mature, anti-inflammatory phenotype to LPS-matured Mo-DCs. Interestingly, both C4BP(β^-) variants also showed a comparable immunomodulatory activity, as confirmed by downregulation of the CD83 and CD86 surface markers and prevention of pro-inflammatory IL-12 and TNF- α production in LPS-stimulated Mo-DCs (Figures 2B, C). Therefore, both PRP5/8-HO7 and PRP6-HO7 variants retained the full immunomodulatory activity ascribed to C4BP(β^-), and PRP6-HO7 was selected for further characterization.

Oligomerization is Necessary to Preserve the Immunomodulatory Activity of PRP6-HO7

PRP6-HO7 has a predicted heptameric structure analogous to the physiologic C4BP(β^-) isoform, according to a comparative protein structure modeling analysis performed taking into account previous available structural data from the CCP1 and CCP2 domains of the C4BP α -chain and the C-terminal heptameric core complex of C4BP (17, 18). This novel recombinant protein appears as a compact symmetrical unit composed of seven CCP6 domain chains joined in their C-terminus to the C4BP oligomerization domain, forming a non-glycosylated radial spider-like heptamer (Figure 3A).

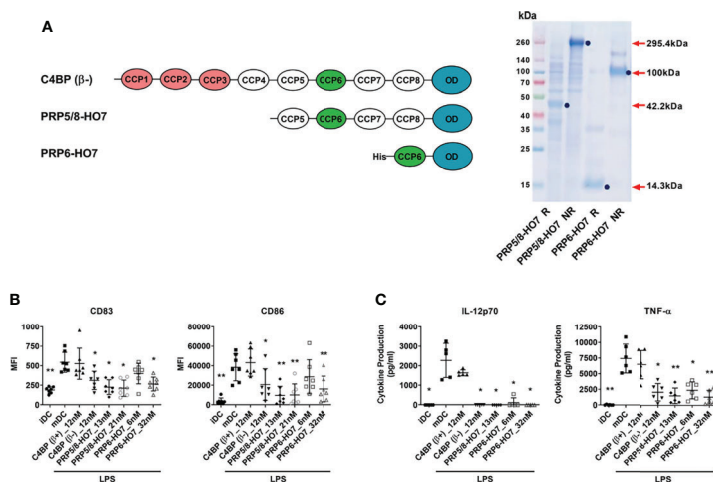


FIGURE 2 | Deletion of the complement inhibitory domains of C4BP(β^-) does not affect its immunomodulatory activity. **(A)** Left: Schematic structure of the α -chains from C4BP(β^-), and from its variants PRP5/8-HO7 and PRP6-HO7. The CCP1-CCP3 complement inhibitory domains are depicted in red. The CCP6 immunomodulatory domain is depicted in green. The oligomerization domain (OD) is depicted in blue. "His" refers to a poly-histidine tag located at the N-terminus of PRP6-HO7. Right: SDS-PAGE and Coomassie Blue staining of both PRP5/8-HO7 and PRP6-HO7 under reducing (R) and non-reducing (NR) conditions. Red arrows and blue dots indicate the location and size of both reduced and non-reduced protein forms. Left lane, molecular weight marker. **(B)** Human Mo-DCs were incubated throughout their differentiation process with C4BP(β^+), C4BP(β^-) (both at 12 nM) and the variants PRP5/8-HO7 and PRP6-HO7 at the indicated concentrations. DC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of the activation marker CD83 and the co-stimulatory molecule CD86. MFI, median fluorescence intensity for the different surface markers. **(C)** The concentrations of IL-12p70 and TNF- α were analyzed in the respective cell supernatants by ELISA. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, LPS-matured DCs. The results shown are the mean \pm SD from 7 independent donors (cell surface markers), or from 5-6 independent donors performed in duplicate (cytokines) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with mDC).

To investigate whether oligomerization of the C4BP CCP6 immunomodulatory domain was indeed necessary to preserve its immunomodulatory activity, we compared the functional outcome of heptavalent PRP6-HO7 with that of an analogous variant, PRP6-NO, comprising the CCP6 domain and a mutated oligomerization domain engineered by substitution of two Cys residues (C498A/C510A) essential for correct folding plus the additional truncation of its 13 C-terminal amino acids (15). As expected and confirmed through PAGE and both Coomassie Blue staining and Western blot analysis under reducing and non-reducing conditions, PRP6-HO7 folded into a heptameric 100 kDa structure consisting of seven monomer chains of 14.3 kDa, which included the CCP6 domain and the C-terminal oligomerization domain of C4BP. On the other hand, PRP6-NO could not oligomerize under non-reducing conditions and remained as a single monomer of 12.7 kDa (**Figure 3B**).

Both C4BP(β +) and PRP6-NO had no effect on the expression of the DC activation marker CD83 and the DC co-stimulatory molecule CD86 on LPS-matured DCs. Conversely, PRP6-HO7, analogously to C4BP(β -), significantly down-regulated these markers (**Figure 3C**).

On the other hand, the antigen internalization capacity of DCs was assessed by flow cytometry of self-quenching DQ-OVA (mannose receptor-mediated endocytosis marker). Thus, the endocytic activity of iDCs was significantly increased by treatment with either C4BP(β -) or PRP6-HO7 but neither by monomeric PRP6-NO nor by the inactive molecule C4BP(β +) (**Figure 3D**).

We next assessed whether the effect of the different C4BP-derived proteins on the DC phenotype was accompanied by changes in their release of pro-inflammatory cytokines (IL-12 and TNF- α). Compared to untreated iDCs, secretion of each of these cytokines was up-regulated when iDCs were matured with LPS. Furthermore, DCs pre-treated with both C4BP(β +) and PRP6-NO secreted the same cytokine levels as untreated DCs upon maturation. In contrast, pre-treatment with both C4BP(β -) and PRP6-HO7 prevented the release of IL-12 and significantly decreased the release of TNF- α (**Figure 3E**). Thus, Th1 pro-inflammatory cytokine production upon LPS-mediated DC stimulation was significantly diminished by PRP6-HO7-treated DCs.

DCs treated with the different C4BP-derived molecules remained highly viable throughout the differentiation/maturation process, as assessed by annexin V/7-ADD staining, with less than 10% apoptotic cells evidenced at 48 h after LPS-mediated DC maturation (data not shown).

Together, these data are evidence that oligomeric PRP6-HO7, but not monomeric PRP6-NO, has the potential to modify pro-inflammatory DC differentiation/maturation towards an anti-inflammatory and tolerogenic phenotype.

PRP6-HO7 Lacks Complement Inhibitory Activity

One of the major regulatory functions of C4BP is to serve as a cofactor for the serine protease factor I to inactivate C4b, also termed cofactor activity. To confirm that PRP6-HO7 was indeed

devoid of complement inhibitory activity, allocated to the CCP1-CCP3 domains of the C4BP α -chain, we performed a comparative C4BP cofactor activity assay evaluating its contribution on factor I-mediated cleavage of C4b in solution. Thus, both C4BP(β +) and C4BP(β -), but not PRP6-HO7 at any of the concentrations tested, were able to act as a cofactor for factor I cleavage of the C4b α' -chain, yielding the 70 kDa partial cleavage fragment α 3-C4d and the small fragment C4d (45 kDa) (**Figure 4**).

PRP6-HO7 Attenuates TLR-Mediated Activation of Mo-DCs

We assessed whether PRP6-HO7 was able to restrain the expression of different monocyte and DC surface activation markers, including CD83, CD86, CD80, CD40, and HLA-DR when upregulated through human TLR1 to TLR9, which recognize pathogen-associated microbial patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs), able to stimulate antigen presentation and promote efficient T cell help. C4BP(β +) had no effect on the expression of any of the above markers in DCs matured with the indicated TLR agonists. In contrast, both C4BP(β -) and PRP6-HO7 significantly down-regulated not only CD83 and CD86, as previously stated, but also the co-stimulatory molecules CD80 and CD40, and the MHC class II cell surface receptor HLA-DR on Mo-DCs activated by all extracellular (**Figure 5**) and intracellular (**Figure 6**) TLRs but TLR9, which is not expressed in these cells (26).

These data confirm that PRP6-HO7 has the potential to prevent TLR-induced pro-inflammatory DC differentiation/maturation as judged by the expression pattern of various cell surface markers. In contrast, neither PRP6-HO7 alone nor PRP6-HO7 plus LPS incubated from day 5 to day 7 (maturation) affected DC surface marker expression (data not shown).

Human Serum Does not Interfere With the PRP6-HO7 Immunomodulatory Activity

To infer the behavior of PRP6-HO7 in a more complex environment we analyzed CD83 and CD86 surface marker expression on DCs differentiated and LPS-matured in presence of 50% autologous serum. Analogously to C4BP(β -), PRP6-HO7 was able to significantly downregulate the above markers in a dose-dependent manner (**Supplementary Figure 1**). Thus, PRP6-HO7 was as active as its counterpart C4BP(β -) in immunomodulation under a cell-free, near to circulatory system state.

PRP6-HO7 Alters the Chemotaxis and T Cell Alloproliferation Capacities of Mo-DCs

Maturation signals determine the expression of distinct DC functions, such as migration towards lymph node-directing chemokines. Both C4BP(β -) and PRP6-HO7 treatments down-regulated the expression of the chemokine receptor CCR7 (**Figures 7A, B**). Reduced surface CCR7 expression, in turn, significantly decreased the migration of LPS-matured DCs towards the chemokine CCL21 (**Figure 7C**). In contrast, LPS maturation of both untreated and C4BP(β +) treated DCs induced a substantial migration in response to CCL21.

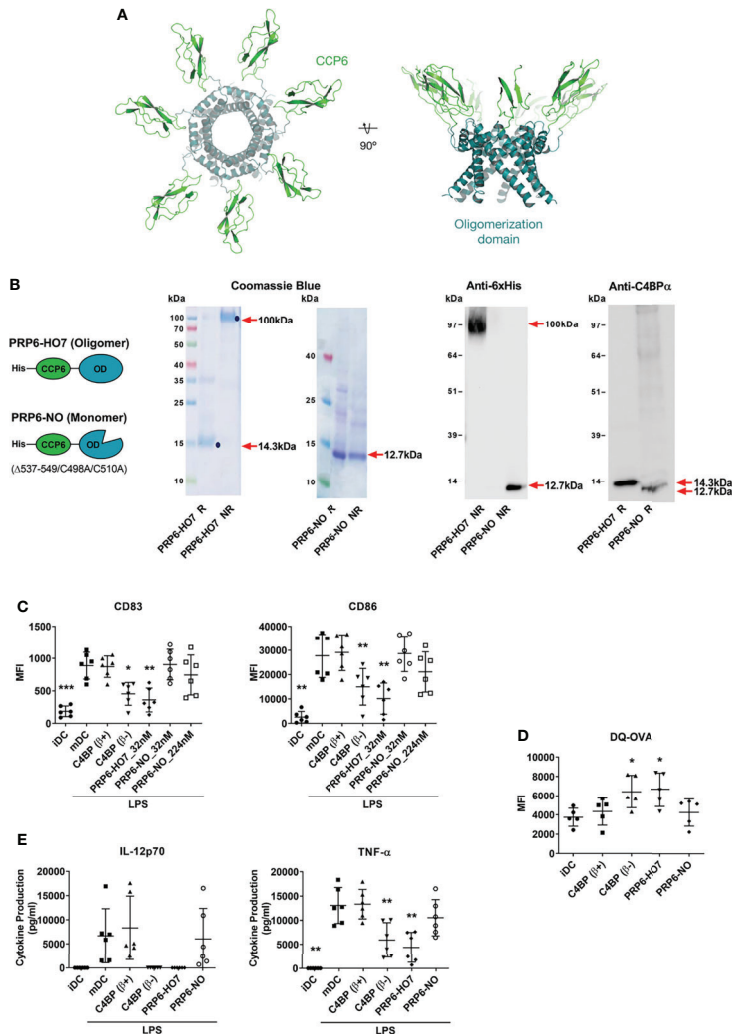
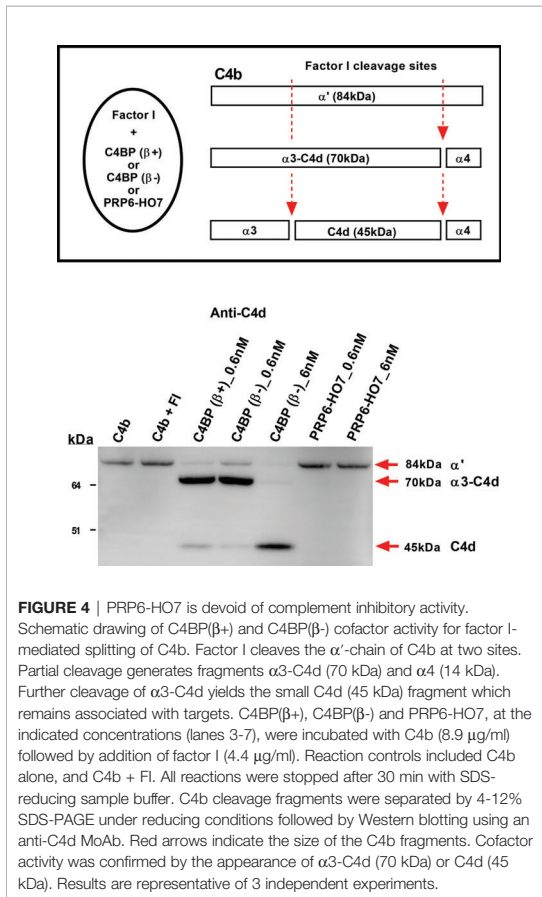


FIGURE 3 | Oligomerization is necessary to preserve the immunomodulatory activity of the C4BP α -chain CCP6 domain. **(A)** Molecular modeling of PRP6-HO7. PRP6-HO7 homo-oligomer structure prediction by comparative protein structure modeling with MODELLER. PRP6-HO7 is shown in cartoon representation. The N-terminal CCP6 domain and the C-terminal oligomerization domain are shown in green and blue, respectively. **(B)** Schematic structure of the monomer chain from the PRP6-HO7 heptamer, and from PRP6-NO, unable to oligomerize because of a mutated/truncated OD. PRP6-HO7 and PRP6-NO were visualized by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining, and by Western analysis against anti-His and anti-C4BP α -chain antibodies, under both reducing (R) (PRP6-HO7 monomer, 14.3 kDa; PRP6-NO, 12.7 kDa) and non-reducing (NR) (PRP6-HO7 oligomer, 100 kDa; PRP6-NO, 12.7 kDa) conditions. Red arrows indicate the respective molecular weights. **(C)** Human Mo-DCs were incubated throughout their differentiation process with C4BP(β +), C4BP(β -), PRP6-HO7, and PRP6-NO (both at 32 nM, unless otherwise stated). DC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of the activation marker CD83 and the co-stimulatory molecule CD86. MFI, median fluorescence intensity for the different surface markers. The results shown are the mean \pm SD from 6 independent donors ($^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ compared with mDC). **(D)** Comparative endocytic activity of Mo-DCs was also assessed by flow cytometry, measuring fluorescent DQ-OVA internalization (receptor-mediated endocytosis) at the differentiation stage, after treatment with C4BP(β +), C4BP(β -), PRP6-HO7, and PRP6-NO. Data shown are the mean MFI \pm SD from 5 independent experiments ($^*p < 0.05$ compared with iDC). **(E)** The concentrations of IL-12p70 and TNF- α were analyzed in the cell supernatants from **(C)**, except the PRP6-NO_224 nM sample, by ELISA. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, LPS-matured DCs. The results shown are the mean \pm SD from 6 independent donors performed in duplicate ($^{**}p < 0.01$ compared with mDC).



Tolerogenic Mo-DCs generated through the C4BP(β -) isoform were previously found to impact on the proliferation of allogeneic T cells and their polarization towards a Th1 phenotype (13). Accordingly, we next examined the immunostimulatory capacity of Mo-DCs exposed to PRP6-HO7. When Mo-DCs were pre-incubated with the C4BP(β +) isoform and matured with LPS, maximal allogeneic T cell proliferation was observed, similar to that obtained using untreated, LPS-matured Mo-DCs. In contrast, mature Mo-DCs pre-incubated with PRP6-HO7 prevented CD3⁺ T cell proliferation (Figures 7D, E) and IFN- γ production (Figure 7F), approaching the levels observed using iDCs. Thus, PRP6-HO7-treated DCs impair T cell alloproliferation.

PRP6-HO7 Modulates Both TLR-Mediated and Intrinsic Activation in Mo-DCs From Active Autoimmune SLE Patients

SLE is a complex autoimmune disorder characterized by loss of tolerance to self-antigens, increased production of autoantibodies and deposition of complement-fixing immune complexes mainly in

the kidneys. As a proof of concept to assess the immunomodulatory potential of PRP6-HO7 in autoimmune pathologies, we undertook pilot studies in two consecutive small cohorts of SLE patients, mostly with active LN, termed cohort 1 and cohort 2. In cohort 1 we examined whether Mo-DCs from active lupus patients responded to PRP6-HO7 immunomodulation. In cohort 2 we explored whether PRP6-HO7 could revert the intrinsic activation state of these cells.

The demographic and clinical features of cohort 1 are given in **Supplementary Table 1**. Monocytes isolated from these patients, either untreated or treated with C4BP(β +), C4BP(β -) or PRP6-HO7, were differentiated to Mo-DCs and further matured with the TLR4 ligand LPS or the TLR7 agonist gardiquimod. As previously shown, significant immunomodulatory activity from both C4BP(β -) and PRP6-HO7 was observed over Mo-DCs from healthy individuals when matured with pro-inflammatory LPS or gardiquimod (Figures 5, 6). Analogously, C4BP(β -) and PRP6-HO7-treated Mo-DCs isolated from active LN patients and matured with LPS or gardiquimod downregulated not only surface activation markers (CD83, CD86, CD80, CD40), but also pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-12 (the latter only through LPS activation, although it did not reach statistical significance) (Figure 8).

We further analyzed in a second cohort of SLE patients (cohort 2), the majority having a LN flare (**Supplementary Table 2**), the intrinsic expression levels of distinctive surface markers on monocyte-derived non-activated macrophages (M0) (CD64) or monocyte-derived immature DCs (iDC) (CD83, CD86, CD80, CD40, and HLA-DR). Although the number of patients analyzed was small, the expression of the above surface markers, reflecting the inflammatory activation state of the cells, appeared to correlate with typical clinical disease activity parameters from LN. Thus, from the available clinical data, complement proteins such as Factor B negatively correlated with CD83, CD86, CD80 and CD40; C3 negatively correlated with CD83; and C4 tended to negatively correlate with CD83 and CD86. Regarding circulating immunoglobulins, IgG levels negatively correlated with CD83 and CD86, and IgA levels negatively correlated with CD80. In contrast, IgM levels positively correlated with CD80. Anti-C1q levels negatively correlated with CD80 and CD40, and anti-nucleosomes levels negatively correlated with CD83. Concerning immune cells, the blood leukocyte number tended to positively correlate with CD86 and CD40 and, particularly, lymphocyte number positively correlated with CD80 and CD40. Platelet number tended to positively correlate with CD80. Finally, biochemical parameters such as serum creatinine negatively correlated with CD80, serum albumin appeared to negatively correlate with both CD64 and CD83, serum ferritin negatively correlated with CD80 and CD40, and the glomerular filtrate positively correlated with CD80. No significant correlations could be observed with HLA-DR (**Supplementary Figure 2**). Considering this outcome, we set up thresholds of activation for each of the surface markers analyzed. Thus, compared to untreated iDC and M0 from the isolated patients' monocytes, PRP6-HO7 significantly downregulated both the levels and/or

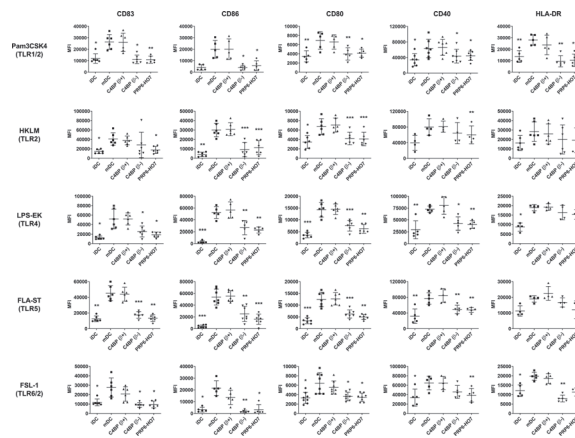


FIGURE 5 | PRP6-HO7 prevents pro-inflammatory surface TLR activation of Mo-DCs. Human Mo-DCs were incubated throughout their differentiation process with C4BP(β +), C4BP(β -) (both at 12 nM) and PRP6-HO7 (32 nM). DC maturation was achieved by TLR agonist treatment: Pam3CSK4 (TLR1/2), HRLM (TLR2), LPS-EK (TLR4), FLA-ST (TLR5), FSL-1 (TLR6/2). Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of CD83, CD86, CD80, CD40 and HLA-DR. MFI, median fluorescence intensity for the different surface markers. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, TLR-matured DCs. The results shown are the mean \pm SD from 4-8 independent donors (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with mDC).

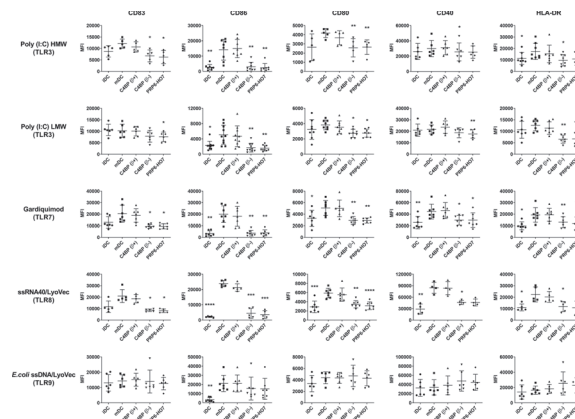


FIGURE 6 | PRP6-HO7 prevents pro-inflammatory intracellular (endosomal) TLR activation of Mo-DCs. Human Mo-DCs were incubated throughout their differentiation process with C4BP(β +), C4BP(β -) (both at 12 nM) and PRP6-HO7 (32 nM). DC maturation was achieved by TLR agonist treatment: Poly I:C HMW (TLR3), Poly I:C LMW (TLR3), Gardiquimod (TLR7), ssRNA40/LyoVec (TLR8), *E.coli* ssDNA/LyoVec (TLR9). Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of CD83, CD86, CD80, CD40 and HLA-DR. MFI, median fluorescence intensity for the different surface markers. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, TLR-matured DCs. The results shown are the mean \pm SD from 4-10 independent donors (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ compared with mDC).

the percentage of cells positive for each of the above markers (Figure 9).

Together, these data suggest that PRP6-HO7 can immunomodulate inflammatory immune cells from patients with active autoimmune lupus nephritis, regardless of their medical history.

DISCUSSION

C4BP is a multifunctional protein with well-known roles within the complement system as a cofactor for factor I-mediated C4b inactivation and promotor of C3 convertase decay (27). In addition, its major isoform, the heterooligomer C4BP(β +),

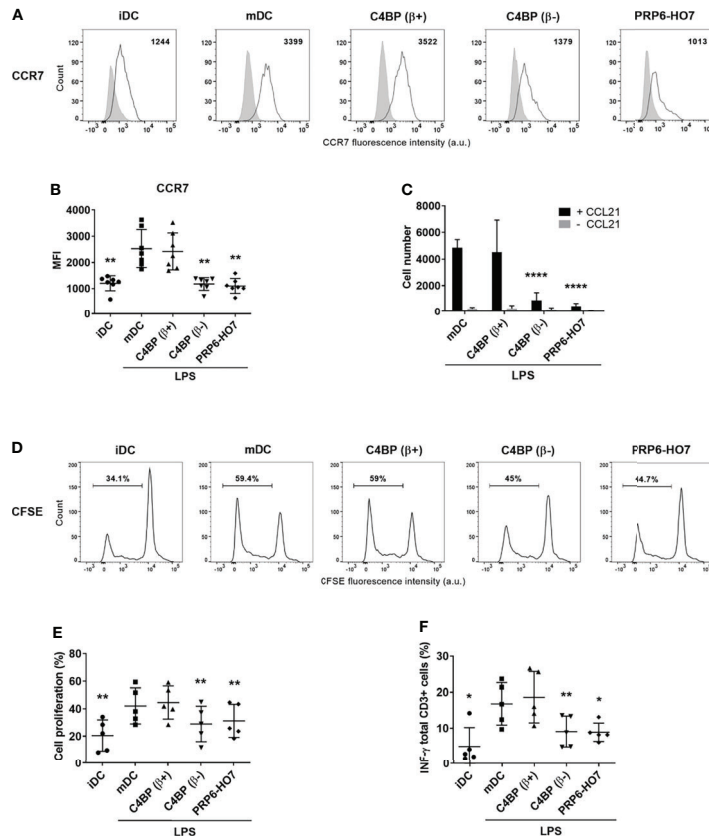


FIGURE 7 | PRP6-HO7 down-regulates CCR7 expression, alters the chemotaxis, and prevents T cell alloproliferation and IFN- γ production in Mo-DCs. CCR7 expression analysis of Mo-DCs at translational level. Representative histograms displaying CCR7 surface expression (A), and its quantification (B) on C4BP(β +) treated, C4BP(β -) treated (both at 12 nM), and PRP6-HO7-treated (32 nM) and LPS-matured DCs. Isotype control is shown in gray. The MFIs for CCR7 cell surface expression are indicated. Results shown are the mean \pm SD from 7 independent donors. (C) Migration of untreated, C4BP(β +) treated, C4BP(β -) treated (both at 12 nM), and PRP6-HO7-treated (32 nM) DCs towards the chemokine CCL21 after LPS maturation was assessed in a transwell assay. Shown are the absolute numbers of LPS-matured DCs (mDC) migrated toward the lower CCL21-containing chamber after 2 h incubation (black columns). Spontaneous migration of DCs towards a lower chamber without CCL21 was also assessed (grey columns). Results are the mean \pm SD from 7 independent donors performed in duplicate. Allogeneic CD3+ T cells were labeled with the CFSE dye and co-cultured with C4BP(β +) treated, C4BP(β -) treated (both at 12 nM), and PRP6-HO7-treated (32 nM) and LPS-matured DCs at 1:5 DC:T cell ratio. (D) Histograms from one representative experiment indicating the percentage of proliferating cells that have lost the CFSE dye. (E) Quantification of the percentage of T cell proliferation. (F) Percentage IFN- γ production by CD3+ T cells. Results shown are the mean \pm SD from 5 independent donors. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, LPS-matured DCs (* p < 0.05; ** p < 0.01; **** p < 0.0001 compared with mDC).

bound tightly to PS through its β -chain, interacts with dying cells promoting its silent clearance and, therefore, contributes to cellular and tissue homeostasis by preventing unnecessary inflammation (28). Nevertheless, the ultimate reason for the existence of C4BP isoforms with different α - and β -chain composition and the physiological relevance of the minor C4BP isoforms have not been yet clarified. We identified an additional immunomodulatory activity in the most abundant of the minor C4BP isoforms, the homooligomer C4BP(β -), which is not present in the major C4BP(β +) isoform. This activity was localized in the internal CCP6 domain of the C4BP α -chain (13).

Although all circulating C4BP(β +) molecules are bound to PS abolishing its anticoagulant function, in this report we reveal that the C4BP β -chain, unaided by PS, is responsible for the lack of immunomodulatory activity of C4BP(β +) molecules. Oligomeric C4BP comprises 60-amino acid CCP or sushi domains arrayed linearly shaping its α - and β -chains and holds a spider-like structure, with the carboxy-terminal ends of the seven CCP8 α -chains and the CCP3 β -chain joined together through the oligomerization domain (29, 30). This modularity endows the different C4BP isoforms with the flexibility to interact with C4b, although each molecule of C4BP can only bind four molecules of

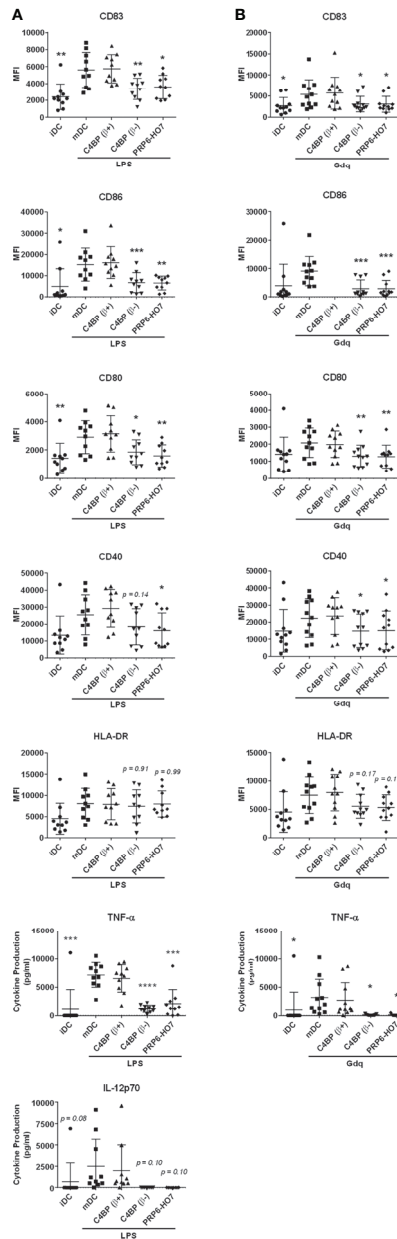
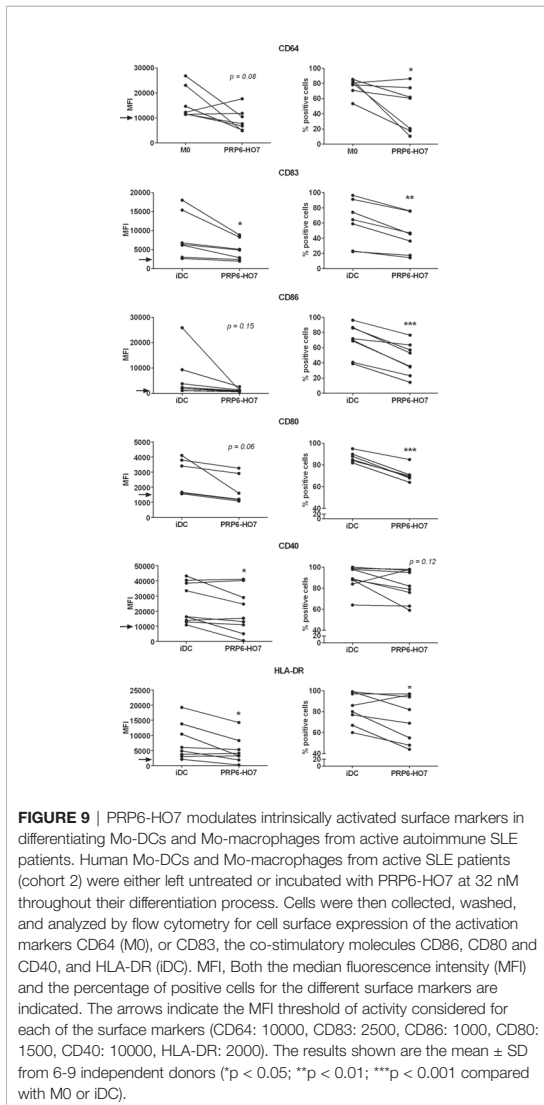


FIGURE 8 | PRP6-HO7 displays immunomodulatory activity in differentiating Mo-DCs and Mo-macrophages from active autoimmune SLE patients. Human Mo-DCs from active SLE patients (cohort 1) were incubated throughout their differentiation process with C4BP(β+) and C4BP(β-) (both at 12 nM), and with PRP6-HO7 at 32 nM. DC maturation was achieved by LPS (A) or gardiquimod (GdQ) (B) treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of the activation marker CD83, the co-stimulatory molecules CD86, CD80 and CD40, and HLA-DR. MFI, median fluorescence intensity for the different surface markers. The concentrations of IL-12p70, and TNF-α were analyzed in the respective cell supernatants by ELISA. The results shown are the mean ± SD from 10 (LPS) or 11 (GdQ) independent donors. iDC, untreated, immature DCs; mDC, untreated, LPS-matured DCs (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 compared with mDC).



C4b due to steric hindrance (31). Analogously, both the more limited flexibility of the internal CCP6 domain of the α -chain and the presence of the β -chain likely impedes C4BP(β +) proper interaction with the corresponding cell surface receptor(s) through steric hindrance, hindering the immunomodulatory activity evidenced in C4BP(β -).

The murine *C4BPB* gene has become a pseudogene in the mouse and, consequently, mouse C4BP lacks the β -chain (32). Strikingly, the α -chain of mouse C4BP also lacks the CCP6 domain (33, 34). Although seemingly unconnected, these two phenomena could be evolutionarily and functionally related.

Conceivably, upon C4BP β -chain loss, mice might have been forced to opt out the CCP6 domain of C4BP α -chain to avoid increased susceptibility to pathogen infection. It is well known that pathogens recruit C4BP for protection (28). Thus, upon C4BP binding, pathogens could leverage the strong anti-inflammatory and immunomodulatory activity of its CCP6 domain towards the host's innate immune cells as an alternative immune evasion strategy.

We further confirmed the independence of both canonical and non-canonical activities of C4BP(β -). In fact, CCP-deletion variant PRP5/8-HO7, devoid of the N-terminal α -chain CCP1-CCP4 domains critical for C4b and C3b binding and complement inhibition (27), retained the immunomodulatory activity over Mo-DCs. Furthermore, PRP6-HO7, a minimal recombinant variant synthesized by joining the immunomodulatory CCP6 α -chain domain and the oligomerization domain of C4BP, was sufficient to confer full immunomodulatory activity, being devoid not only of the canonical complement inhibitory activity but also of detrimental pathogen binding leading to complement immune evasion. Indeed, recruitment of human C4BP onto the surfaces of Gram-positive and Gram-negative bacteria, viruses and fungi has been described (28, 35), rendering the host more susceptible to infection episodes (36). We also demonstrated that the CCP6 domain of the C4BP α -chain needs to be oligomerized, analogously to C4BP(β -), to preserve full immunomodulatory activity. This multivalent structure likely interacts with high avidity on a multivalent receptor or a cluster of monovalent receptors, reminiscent of IgG and IgM molecules. Indeed, the oligomeric, spider-like structure of both C4BP(β -) and PRP6-HO7 suggests that induction of receptor clustering could increase their strength for signaling. In fact, the oligomerization domain of C4BP provides the optimal distance between multiple protein-binding domains to maximize binding affinities to multimeric target receptors *via* multivalent interactions (37, 38) and, consequently, has also been exploited to increase the valency and performance of recombinant antibodies (39), soluble viral receptors (40), apoptosis-inducing peptides (41), or heteromultimeric FHR4-based immunoconjugates selectively activating the complement alternative pathway on tumor cells (42).

Compared with C4BP(β -), oligomeric PRP6-HO7 holds a reduced size (100 kDa) and its compact and symmetrical structure likely impacts positively in its thermodynamic stability and *in vivo* half-life. It has been shown that CCP-containing proteins and, particularly C4BP, hold a remarkable structural and functional stability after being exposed to harsh conditions (43). Moreover, the whole α -helix region constituting the oligomerization domain is required to form stable polymers, which are further stabilized by intermolecular disulfide bond formation and electrostatic interactions (15, 18). Consequently, analogously to C4BP(β -) (13), under a cell-free, near to circulatory system state (50% human serum) PRP6-HO7 displayed full immunomodulatory activity over Mo-DCs, a faithful model of *in vivo* inflammatory DCs (44). Moreover, PRP6-HO7 was able to down-regulate the expression of the maturation marker and immune checkpoint CD83 (45), co-stimulatory and MHC molecules, to abrogate the secretion of pro-inflammatory

cytokines and, conversely, to increase the production of anti-inflammatory cytokines upon pro-inflammatory challenge. In addition, PRP6-HO7-treated Mo-DCs also displayed increased endocytosis, reduced CCR7 expression and chemotaxis, and decreased proliferation and IFN- γ production of co-cultured allogeneic T cells. These outcomes are typical of regulatory or tolerogenic DCs, which hold a semi-mature phenotype characterized by clonal T cell anergy induction and/or metabolic T cell modulation, and anti-inflammatory cytokine production, leading to suppression of effector T cell activity and stimulating the differentiation of regulatory T cells (Tregs) (46–48). Interestingly, “PRP6-HO7-reprogrammed” Mo-DCs prevented the upregulation of activation markers, co-stimulatory molecules, and HLA-DR, regardless of the TLR agonist employed, suggesting that PRP6-HO7 is effective against a plethora of PAMPs and DAMPs, modulating common downstream MYD88- and TRIF-dependent pathways (49, 50).

We recently demonstrated the therapeutic potential of human C4BP(β -) in two autoimmune LN mouse models, which prevented pro-inflammatory immune cell infiltration and the development of ectopic lymphoid structures, suggesting that the putative C4BP(β -) receptor is preserved in mice (14). Here, we have extended our studies to Mo-DCs and Mo-macrophages obtained from SLE patients with active disease and renal involvement. We demonstrated that both C4BP(β -) and PRP6-HO7 significantly prevented CD83 and co-stimulatory molecule (CD86, CD80, CD40) upregulation and pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-12) production in Mo-DCs stimulated with LPS and, particularly, with gardiquimod. This imidazoquinoline is a strong agonist of endosomal TLR7, which has a critical role accelerating disease in SLE (51, 52). Furthermore, in immature Mo-DCs and non-polarized M0 Mo-macrophages differentiated from monocytes isolated after a separate cohort of SLE patients, mostly having an LN flare, PRP6-HO7 again downregulated high-level expression of pro-inflammatory cellular surface molecules such as IFN-I-inducible Fc γ RI/CD64, a biomarker reflecting ongoing inflammation and nephritis in lupus (53, 54), CD83, CD86, CD80, CD40, and HLA-DR without the need of further stimulation. Indeed, these immune cell markers correlated with the most relevant quantitative serum parameters defining LN activity/severity (complement components, immunoglobulins, immune cells, organic compounds, and proteins (creatinine, albumin, ferritin), and with the glomerular filtrate). For example, renal complement deposition has been proposed as a predictor of end-stage renal disease in LN patients (55). Moreover, autoantibodies and pathogenic immune complex accumulation in multiple tissues are also hallmarks of the disease (56, 57). All these events result in the consumption of circulating complement components and hypogammaglobulinemia, except for IgM, which might bind preferentially circulating autoantigens such as dsDNA. Strikingly, although all patients analyzed presented with ongoing medication (hydroxychloroquine, corticoids, and/or immunosuppressants), these treatments seemed to have no influence on the immunomodulatory efficacy of PRP6-HO7, probably because of its distinctive mechanism of action.

CONCLUSION

In summary, the immunomodulatory activity of the minor C4BP(β -) isoform and the specific up-regulation of its expression under strong pro-inflammatory conditions (10, 11, 58) suggests that, besides complement regulation, this isoform exerts an additional level of control from excessive inflammation through a gain of function over the major isoform C4BP(β +), which allows more efficient control of the innate immune system at both the humoral side (complement regulation) and the cellular side (phagocyte immunomodulation). Furthermore, this non-canonical immunomodulatory activity of C4BP(β -) is independent of anticoagulant PS and, therefore, would additionally benefit systemic inflammatory and hypercoagulable conditions such as sepsis (59). Thus, C4BP(β -) directly impacts the cellular innate immune response, acting on pro-inflammatory monocytes, “reprogramming” them from a pro-inflammatory and immunogenic phenotype towards an anti-inflammatory and tolerogenic phenotype, resolving excessive inflammation and “sculpting” the adaptive immune system to circumvent autoimmunity. Accordingly, PRP6-HO7, a C4BP(β -)-based recombinant oligomeric protein, shows a compact structure and is smaller than an antibody in size. Most importantly, PRP6-HO7 displays strong anti-inflammatory and immunomodulatory activities facilitating return to homeostasis and, conversely, lacks complement inhibitory activity and pathogen binding for immune evasion. Thus, its optimal performance and improved safety profile, arising from a natural protection system such as C4BP(β -), supports the development of PRP6-HO7 as a first-in-class biologic for the treatment of SLE and other autoimmune diseases.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the IDIBELL’s ethics committee in accordance with institutional guidelines and the Declaration of Helsinki. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JA conceived and designed the study. IS, AL, FV, FM, SR, CV and JT performed experiments and provided key reagents. IS, AL, AB, SR, CV, JT and JA analyzed and interpreted the data. IS, AL and JA wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

We thank CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support. This work was supported by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Madrid, Spain) (grants FIS-ISCI PI20/00464, PI16/00377 and DTS20/00016), and the “Departament de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya” (grants 2019PROD00081 and 2017SGR291), all co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-a way to build Europe-. Dr. Vega is supported by the Spanish “Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades/FEDER” [RTI2018-102242-B-I00]. Dr. Rodríguez de Córdoba is supported by the Spanish “Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER [SAF2015-66287-R]. Dr. Vega and Dr. Rodríguez de Córdoba are also funded by the Autonomous Region of Madrid [S2017/BMD-3673] and the European Commission – NextGenerationEU through CSIC’s Global Health Platform (“PTI Salud Global”)

REFERENCES

- Freeley S, Kemper C, Le Frieg G. The “Ins and Outs” of Complement-Driven Immune Responses. *Immunol Rev* (2016) 274(1):16–32. doi: 10.1111/immr.12472
- Luque A, Serrano I, Aran JM. Complement Components as Promoters of Immunological Tolerance in Dendritic Cells. *Semin Cell Dev Biol* (2019) 85:143–52. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.11.022
- Liszewski MK, Atkinson JP. Complement Regulators in Human Disease: Lessons From Modern Genetics. *J Intern Med* (2015) 277(3):294–305. doi: 10.1111/joim.12338
- Hourcade D, Liszewski MK, Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Functional Domains, Structural Variations and Pathogen Interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology* (2000) 49(1-2):103–16. doi: 10.1016/s0162-3109(00)80296-9
- Hillarp A, Dahlbäck B. Cloning of cDNA Coding for the Beta Chain of Human Complement Component C4b-Binding Protein: Sequence Homology With the Alpha Chain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87(3):1183–7. doi: 10.1073/pnas.87.3.1183
- Blom AM. Structural and Functional Studies of Complement Inhibitor C4b-Binding Protein. *Biochem Soc Trans* (2002) 30(Pt 6):978–82. doi: 10.1042/bst0300978
- Dahlbäck B. Protein sAnd C4b-Binding Protein: Components Involved in the Regulation of the Protein C Anticoagulant System. *Thromb Haemost* (1991) 66(1):49–61. doi: 10.1055/S-0038-1646373
- Kask L, Trouw LA, Dahlbäck B, Blom AM. The C4b-Binding Protein-Protein S Complex Inhibits the Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Biol Chem* (2004) 279(23):23869–73. doi: 10.1074/jbc.S400159200
- Trouw LA, Nilsson SC, Gonçalves I, Landberg G, Blom AM. C4b-Binding Protein Binds to Necrotic Cells and DNA, Limiting DNA Release and Inhibiting Complement Activation. *J Exp Med* (2005) 201(12):1937–48. doi: 10.1084/jem.20050189
- Sánchez-Corral P, Criado García O, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of Human C4b-Binding Protein. I. Molecular Basis for the C4BP Isoform Pattern and its Variations in Human Plasma. *J Immunol* (1995) 155(8):4030–6.
- Criado García O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of Human C4b-Binding Protein: II. Differential Modulation of the C4BPA and D4BPB Genes by Acute Phase Cytokines. *J Immunol* (1995) 155(8):4037–43.
- Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement Inhibitor C4b-Binding Protein-Friend or Foe in the Innate Immune System? *Mol Immunol* (2004) 40(18):1333–46. doi: 10.1016/j.molimm.2003.12.002
- Olivar R, Luque A, Naranjo-Gómez M, Quer J, García de Frutos P, Borrás FE, et al. The $\alpha 7\beta 0$ Isoform of the Complement Regulator C4b-Binding Protein Induces a Semimature, Anti-Inflammatory State in Dendritic Cells. *J Immunol* (2013) 190(6):2857–72. doi: 10.4049/jimmunol.1200503
- Luque A, Serrano I, Ripoll E, Malta C, Gomà M, Blom AM, et al. Noncanonical Immunomodulatory Activity of Complement Regulator C4BP(β -) Limits the Development of Lupus Nephritis. *Kidney Int* (2020) 97(3):551–66. doi: 10.1016/j.kint.2019.10.016
- Kask L, Hillarp A, Ramesh B, Dahlbäck B, Blom AM. Structural Requirements for the Intracellular Subunit Polymerization of the Complement Inhibitor C4b-Binding Protein. *Biochemistry* (2002) 41(30):9349–57. doi: 10.1021/bi025980+
- Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinf* (2016) 54:5.6.1–5.6.37. doi: 10.1002/cpbi.3
- Buffalo CZ, Bahn-Suh AJ, Hirikis SP, Biswas T, Amaro RE, Nizet V, et al. Conserved Patterns Hidden Within Group A Streptococcus M Protein Hypervariability Recognize Human C4b-Binding Protein. *Nat Microbiol* (2016) 1(11):16155. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.155
- Hofmeyer T, Schmelz S, Degiacomi MT, Dal Peraro M, Dameschdar M, Scrima A, et al. Arranged Sevenfold: Structural Insights Into the C-Terminal Oligomerization Domain of Human C4b-Binding Protein. *J Mol Biol* (2013) 425(8):1302–17. doi: 10.1016/j.jmb.2012.12.017
- Shen MY, Sali A. Statistical Potential for Assessment and Prediction of Protein Structures. *Protein Sci* (2006) 15(11):2507–24. doi: 10.1110/ps.062416606
- Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and Better Reference Data for Improved All-Atom Structure Validation. *Protein Sci* (2018) 27(1):293–315. doi: 10.1002/pro.3330
- Hillarp A, Dahlbäck B. Novel Subunit in C4b-Binding Protein Required for Protein S Binding. *J Biol Chem* (1988) 263(25):12759–64. doi: 10.1016/S0021-9258(18)37818-9
- Härdig Y, Dahlbäck B. The Amino-Terminal Module of the C4b-Binding Protein β -Chain Contains the Protein S-Binding Site. *J Biol Chem* (1996) 271(34):20861–7. doi: 10.1074/jbc.271.34.20861
- Mohlin FC, Blom AM. Purification and Functional Characterization of C4b-Binding Protein (C4BP). *Methods Mol Biol* (2014) 1100:169–76. doi: 10.1007/978-1-62703-724-2_14
- Dahlbäck B. Inhibition of Protein C₂ Cofactor Function of Human and Bovine Protein S by C4b-Binding Protein. *J Biol Chem* (1986) 261(26):12022–7. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67196-0
- Blom AM, Kask L, Dahlbäck B. Structural Requirements for the Complement Regulatory Activities of C4BP. *J Biol Chem* (2001) 276(29):27136–44. doi: 10.1074/jbc.M102445200
- Schreibelt G, Tel J, Slieden KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, et al. Toll-Like Receptor Expression and Function in Human Dendritic Cell Subsets: Implications for Dendritic Cell-Based Anti-Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2010) 59(10):1573–82. doi: 10.1007/s00262-010-0833-1
- Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Mutations in Alpha-Chain of C4BP That Selectively Affect its Factor I Cofactor Function. *J Biol Chem* (2003) 278(44):43437–42. doi: 10.1074/jbc.M306620200

[SGL2103020]. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the “Unitat Funcional de Malalties Autoimmunitaries Sistèmiques” (UFMAS) from the Bellvitge Hospital for providing the SLE patients referred in the present study.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.883743/full#supplementary-material>

28. Ermer D, Blom AM. C4b-Binding Protein: The Good, the Bad and the Deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett* (2016) 169:82–92. doi: 10.1016/j.imlet.2015.11.014
29. Dahlbäck B, Smith CA, Müller-Eberhard HJ. Visualization of Human C4b-Binding Protein and its Complexes With Vitamin K-Dependent Protein S and Complement Protein C4b. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) 80(11):3461–5. doi: 10.1073/pnas.80.11.3461
30. Villoutreix BO, Blom AM, Webb J, Dahlbäck B. The Complement Regulator C4b-Binding Protein Analyzed by Molecular Modeling, Bioinformatics and Computer-Aided Experimental Design. *Immunopharmacology* (1999) 42(1–3):121–34. doi: 10.1016/s0162-3109(99)00022-3
31. Ziccardi RJ, Dahlbäck B, Müller-Eberhard HJ. Characterization of the Interaction of Human C4b-Binding Protein With Physiological Ligands. *J Biol Chem* (1984) 259(22):13674–9. doi: 10.1016/S0021-9258(18)89797-6
32. Rodríguez de Córdoba S, Pérez-Blas M, Ramos-Ruiz R, Sánchez-Corral P, Pardo-Manuel de Villena F, Rey-Campos J. The Gene Coding for the Beta-Chain of C4b-Binding Protein (C4BPB) has Become a Pseudogene in the Mouse. *Genomics* (1994) 21(3):501–9. doi: 10.1006/geno.1994.1308
33. Kristensen T, Ogata RT, Chung LP, Reid KB, Tack BF. cDNA Structure of Murine C4b-Binding Protein, a Regulatory Component of the Serum Complement System. *Biochemistry* (1987) 26(15):4668–74. doi: 10.1021/bi00389a012
34. Hillarp A, Wiklund H, Thern A, Dahlbäck B. Molecular Cloning of Rat C4b Binding Protein Alpha- and Beta-Chains: Structural and Functional Relationships Among Human, Bovine, Rabbit, Mouse, and Rat Proteins. *J Immunol* (1997) 158(3):1315–23.
35. Hovingh ES, van den Broek B, Jongerius I. Hijacking Complement Regulatory Proteins for Bacterial Immune Evasion. *Front Microbiol* (2016) 7:2004. doi: 10.3389/fmicb.2016.02004
36. Ermer D, Shaughnessy J, Joeris T, Kaplan J, Pang CJ, Kurt-Jones EA, et al. Virulence of Group A Streptococci is Enhanced by Human Complement Inhibitors. *PLoS Pathog* (2015) 11(7):e1005043. doi: 10.1371/journal.ppat.1005043
37. Galimidi RP, Klein JS, Politzer MS, Bai S, Seaman MS, Nussenzeiwig MC, et al. Intra-Spike Crosslinking Overcomes Antibody Evasion by HIV-1. *Cell* (2015) 160(3):433–46. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.016
38. Bandlow V, Liese S, Lauster D, Ludwig K, Netz RR, Herrmann A, et al. Spatial Screening of Hemagglutinin on Influenza A Virus Particles: Sialyl-LacNAc Displays on DNA and PEG Scaffolds Reveal the Requirements for Bivalency Enhanced Interactions With Weak Monovalent Binders. *J Am Chem Soc* (2017) 139(45):16389–97. doi: 10.1021/jacs.7b09967
39. Libyh MT, Goossens D, Oudin S, Gupta N, Derveliev X, Juszcak G, et al. A Recombinant Human scFv Anti-Rh(D) Antibody With Multiple Valences Using a C-Terminal Fragment of C4b-Binding Protein. *Blood* (1997) 90(10):3978–83. doi: 10.1182/blood.V90.10.3978
40. Christiansen D, Devaux P, Réveil B, Evlashev A, Horvat B, Lamy J, et al. Octamerization Enables Soluble CD46 Receptor to Neutralize Measles Virus *In Vitro* and *In Vivo*. *J Virol* (2000) 74(10):4672–8. doi: 10.1128/jvi.74.10.4672-4678.2000
41. Valldorf B, Fittler H, Deweid L, Ebenig A, Dickgiesser S, Sellmann C, et al. An Apoptosis-Inducing Peptidic Heptad That Efficiently Clusters Death Receptor 5. *Angew Chem Int Ed Engl* (2016) 55(16):5085–9. doi: 10.1002/anie.201511894
42. Seguin-Devaux C, Plessier J, Verschuere C, Masquelier C, Iserentant G, Fullana M, et al. FHR4-Based Immunoconjugates Direct Complement-Dependent Cytotoxicity and Phagocytosis Towards HER2-Positive Cancer Cells. *Mol Oncol* (2019) 13(12):2531–53. doi: 10.1002/1878-0261.12554
43. Kask L, Villoutreix BO, Steen M, Ramesh B, Dahlbäck B, Blom AM. Structural Stability and Heat-Induced Conformational Change of Two Complement Inhibitors: C4b-Binding Protein and Factor H. *Protein Sci* (2004) 13(5):1356–64. doi: 10.1110/ps.03516504
44. Sander J, Schmidt SV, Cirovic B, McGovern N, Papanonopoulou O, Hardt AL, et al. Cellular Differentiation of Human Monocytes is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity* (2017) 47(6):1051–66. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.024
45. Grosche L, Knippertz I, König C, Royzman D, Wild AB, Zinser E, et al. The CD83 Molecule- An Important Immune Checkpoint. *Front Immunol* (2020) 11:721. doi: 10.3389/fimmu.2020.00721
46. Morante-Palacios O, Fondelli F, Ballestar E, Martínez-Cáceres EM. Tolerogenic Dendritic Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. *Trends Immunol* (2021) 42(1):59–75. doi: 10.1016/j.it.2020.11.001
47. Iberg CA, Hawiger D. Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells. *J Immunol* (2020) 204(4):733–44. doi: 10.4049/jimmunol.1901121
48. Passeri L, Marta F, Bassi V, Gregori S. Tolerogenic Dendritic Cell-Based Approaches in Autoimmunity. *Int J Mol Sci* (2021) 22(16):8415. doi: 10.3390/ijms22168415
49. Kawai T, Akira S. The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-Like Receptors. *Nat Immunol* (2010) 11(5):373–84. doi: 10.1038/ni.1863
50. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* (2003) 301(5633):640–3. doi: 10.1126/science.1087262
51. Santiago-Raber ML, Dunand-Sauthier I, Wu T, Li QZ, Uematsu S, Akira S, et al. Critical Role of TLR7 in the Acceleration of Systemic Lupus Erythematosus in TLR9-Deficient Mice. *J Autoimmun* (2010) 34(4):339–48. doi: 10.1016/j.jaut.2009.11.001
52. Kazazian NH, Wang Y, Roussel-Queval A, Marcadet L, Chasson L, Laprie C, et al. Lupus Autoimmunity and Metabolic Parameters are Exacerbated Upon High Fat Diet-Induced Obesity Due to TLR7 Signaling. *Front Immunol* (2019) 10:2015. doi: 10.3389/fimmu.2019.02015
53. Li Y, Lee PY, Sobel ES. Increased Expression of Fc γ RI/CD64 on Circulating Monocytes Parallels Ongoing Inflammation and Nephritis in Lupus. *Arthritis Res Ther* (2009) 11(1):R6. doi: 10.1186/ar2590
54. Li Y, Lee PY, Kellner ES, Paulus M, Switaneck J, Xu Y, et al. Monocyte Surface Expression of Fc γ Receptor RI (CD64), a Biomarker Reflecting Type-I Interferon Levels in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Res Ther* (2010) 12(3):R90. doi: 10.1186/ar3017
55. Koopman JJE, Renne HG, Leatherwood C, Speyer CB, D'Silva K, McMahon GM, et al. Renal Deposits of Complement Factors as Predictors of End-Stage Renal Disease and Death in Patients With Lupus Nephritis. *Rheumatology* (2020) 59(12):3751–8. doi: 10.1093/rheumatology/keaa174
56. Lech M, Anders HJ. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* (2013) 24(9):1357–66. doi: 10.1681/ASN.2013010026
57. Sterner RM, Hartono SP, Grande JP. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Clin Cell Immunol* (2014) 5(2):205. doi: 10.4172/2155-9899.1000205
58. García de Frutos P, Alim RI, Hårdig Y, Zöller B, Dahlbäck B. Differential Regulation of α and β Chains of C4b-Binding Protein During Acute-Phase Response Resulting in Stable Plasma Levels of Free Anticoagulant Protein s. *Blood* (1994) 84(3):815–22. doi: 10.1182/blood.V84.3.815.815
59. Scarlatescu E, Tomescu D, Arama SS. Sepsis-Associated Coagulopathy. *J Crit Care Med* (2016) 2(4):156–63. doi: 10.1515/jccm-2016-0024

Conflict of Interest: IS, AL and JA are co-inventors on pending or issued patents involving compounds and methods for immunomodulation.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Serrano, Luque, Mitjavila, Blom, Rodríguez de Córdoba, Vega, Torras and Aran. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact



SERRANO SANTACRUZ, Inmaculada
Puigcerdà 283, 2^a 2^a
E-08020 Barcelona
ESPAGNE

Date
10.12.19

Reference	Application No./Patent No. 19382910.8 - 1120
Applicant/Proprietor Fundació Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 17.10.19
PRIORITY : //
TITLE : COMPOUNDS FOR IMMUNOMODULATION
DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/ARAN PERRAMON, Josep M./Avda/ Llibertat, 63 4^o2/E-08100 Mollet del Vallès,
Barcelona/ES
1/LUQUE GÓMEZ, Ana/Pablo Iglesias, 73 Escalera B, 5^o, 3^a/E-08016 Barcelona/ES
1/SERRANO SANTACRUZ, Inmaculada/Puigcerdà 283, 2^a 2^a/E-08020 Barcelona/ES

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:

The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).

Receiving Section





UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA