



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

Análisis de la naturaleza genético-ambiental en el lupus
eritematoso sistémico: papel del gen *Bank1* y la composición
de la microbiota intestinal

María Botía Sánchez

Directoras de la tesis:

Dra. Marta E. Alarcón Riquelme

Dra. Georgina Galicia

Granada, octubre de 2024.



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE **GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Botía Sánchez
ISBN: 978-84-1195-733-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/102865>

El doctorando / *The Doctoral Candidate* **María Botía Sánchez** y los directores de la tesis / *and the thesis supervisor/s*: **Dra. Marta E. Alarcón Riquelme** y / *and* **Dra. Georgina Galicia**.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results have been used) have been respected.

Granada, 4 de octubre de 2024

Directores de tesis

Doctorando

Thesis supervisors

Doctoral candidate

Marta E. Alarcón-Riquelme

Georgina Galicia

María Botía Sánchez

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Publicación de un artículo científico aceptado en revistas relevantes en el campo de conocimiento de la tesis doctoral, firmada por el doctorando, incluyendo parte de los resultados de la tesis doctoral:

Botía-Sánchez M, Galicia G, Albaladejo-Marico L, Toro-Domínguez D, Morell M, Marcos-Fernández R, Margolles A, Alarcón-Riquelme ME. Gut epithelial barrier dysfunction in lupus triggers a differential humoral response against gut commensals. *Front Immunol.* 2023 May 24;14:1200769. doi: 10.3389/fimmu.2023.1200769. PMID: 37346043; PMCID: PMC10280985.

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada

Estancia doctoral en un centro de investigación extranjero:

Estancia en el laboratorio de Microbiota e Inflamación, perteneciente al departamento de Citometría del Instituto Alemán de Investigación Reumatológica (DRFZ) en Berlín, bajo la supervisión del Dr. Hyun-Dong Chang. Esta estancia se realizó del 1 de abril hasta el 31 de junio de 2024, y fue financiada por la beca de carácter privado de estancias cortas concedida por la Federación Europea de Asociaciones Inmunológicas (EFIS, *European Federation of Immunological Societies*, Short-Term Fellowship) y la beca de carácter público de Plan Propio de la UGR (curso académico 2023/24).

Idioma de la tesis doctoral:

La tesis doctoral ha sido escrita en español y será defendida en español. Adicionalmente, y siguiendo los requerimientos de la Universidad de Granada, parte de la tesis doctoral ha sido escrita en inglés (resumen y conclusiones) como idioma habitual para la comunicación científica. De igual forma, en el acto de defensa, las conclusiones serán expuestas en inglés.

Artículos adicionales durante el periodo de tesis doctoral.

Botía-Sánchez M, Alarcón-Riquelme ME, Galicia G. B Cells and Microbiota in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2021 May 3;22(9):4846. doi: 10.3390/ijms22094846. PMID: 34063669; PMCID: PMC8125537.

Becas y financiación

El trabajo de investigación presentado en esta tesis ha sido realizado en el laboratorio de Genética de Enfermedades Complejas en el centro de Investigación Centro Pfizer- Universidad de Granada- Junta de Andalucía de Genómica e Investigación oncológica (**GENYO**).

Este proyecto de tesis se encuadra dentro del proyecto de investigación de la contribución de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo del lupus eritematoso sistémico. La financiación para dicha línea se ha obtenido de la beca Marie Curie postdoctoral concedida a la Dra. Marta E. Alarcón-Riquelme y a la Dra. Georgina Galicia (GAP 838548), el proyecto de la Conserjería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía PE-0297-2019 (Dra. Marta E. Alarcón-Riquelme), el proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad SAF2016-78631-P (Dra. Marta E. Alarcón-Riquelme) y el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación PID2020-113776GB-100 (Dra. Marta E. Alarcón-Riquelme).

La financiación salarial de María se ha obtenido del proyecto PE-0297-2019 desde el año 2020 hasta el año 2024.

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	13
1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	13
1.1. Fisiopatología	14
1.2. Manifestaciones.....	21
1.3. Tratamiento y manejo.....	24
2. MODELOS ANIMALES.....	26
2.1. Modelos espontáneos.....	26
2.1. Modelos inducidos	30
2.2. Modelos humanizados.....	32
3. ETIOLOGÍA DEL LES	32
3.1. Genes de susceptibilidad.....	33
3.2. Factores ambientales.....	40
4. MICROBIOTA INTESTINAL.....	42
4.1. Microbiota y autoinmunidad	42
4.2. Regulación de la composición bacteriana	45
4.3. Estudio de la composición bacteriana.....	48
4.4. Técnicas de normalización de microbiota.....	52
5. INMUNOLOGÍA DEL GALT	56
5.1. Estructura y funcionamiento inmunitario	56
5.2. Componente humoral: IgA y homeostasis.....	57
5.3. Barrera intestinal	60
6. CÉLULAS B REGULADORAS Y MICROBIOTA	62

6.1.	Citoquinas con función reguladora.....	64
6.2.	Inducción de células B reguladoras	67
	HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	69
	OBJETIVOS.....	71
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
1.	Modelos de experimentación.....	75
1.1.	Declaración de aprobación de experimentación animal.....	75
1.2.	Cepas de ratones y mantenimiento.....	75
1.3.	Modelos de lupus.....	76
1.4.	Extracción de muestras <i>in vivo</i>	78
1.5.	Medida de la permeabilidad intestinal <i>in vivo</i>	78
1.6.	Sacrificio animal	79
2.	Procesamiento de órganos y tejidos.	80
2.1.	Bazo.....	80
2.2.	Intestino.....	80
2.3.	Riñón.....	82
2.4.	Procesamiento de heces y aislamiento de bacterias fecales.	84
3.	Ensayos celulares.	84
3.1.	Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	84
3.2.	Citometría de flujo.	85
3.3.	Aislamiento de células B y cultivos <i>in vitro</i>	90
4.	ELISAs.....	91
4.1.	ELISA para la detección de anticuerpos.....	91
4.2.	ELISA para la detección de inmunoglobulinas totales.....	92
4.3.	ELISA de bacterias fecales con sueros autólogos y heterólogos.....	93
5.	Análisis de la composición de la microbiota.	94

5.1.	Análisis de la composición de microbiota basado en citometría de flujo	94
5.2.	Identificación taxonómica.....	98
5.3.	Medida de la translocación bacteriana.....	101
6.	Análisis estadístico.....	101
RESULTADOS.....		105
1.	Caracterización del modelo murino mediado por la sobreexpresión de TLR7.	105
1.1.	Los ratones TLR7Tg desarrollan una enfermedad autoinmune....	105
1.2.	La sobreexpresión de TLR7 induce alteraciones inmunitarias y estructurales en el intestino.....	107
1.3.	El desarrollo del lupus mediado por TLR7 induce disbiosis intestinal.	111
1.4.	La disrupción de la barrera intestinal en los ratones TLR7Tg modula la respuesta sistémica frente a los comensales.....	114
2.	La ausencia del gen <i>Bank1</i> modula la respuesta inmunitaria intestinal y sistémica en ratones control y con lupus.....	121
2.1.	La eliminación de <i>Bank1</i> modifica la respuesta inmunitaria intestinal en condiciones basales.....	123
2.2.	Los ratones deficientes para <i>Bank1</i> desarrollan lupus con una menor severidad.	126
2.3.	<i>Bank1</i> regula la respuesta inmunitaria celular y humoral en el intestino de ratones con lupus.	132
3.	La señalización por <i>Bank1</i> regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.....	134
3.1.	Análisis de la respuesta inmunitaria IgA e IgG hacia la microbiota fecal	134
3.2.	Análisis de la composición de la microbiota.....	144
4.	La microbiota generada por la ausencia de <i>Bank1</i> induce un papel protector en ratones con lupus.....	156

4.1. La transferencia vertical de la microbiota asociada a la deficiencia de <i>Bank1</i> ejerce un papel protector en el desarrollo del lupus.....	159
4.2. La administración externa de <i>Parabacteroides distasonis</i> induce una fenocopia del cuadro de lupus desarrollado en ratones B1KO.....	173
5. La microbiota protectora asociada a la deficiencia de <i>Bank1</i> induce la diferenciación de células B productoras de IL-10.....	186
5.1. Las células B intestinales de ratones <i>Bank1</i> ^{-/-} tienen una mayor capacidad de diferenciarse hacia potenciales células B reguladoras.....	186
5.2. <i>Parabacteroides distasonis</i> actúa como un potente inductor de células B productoras de IL-10 <i>in vivo</i>	187
6. Análisis global de la respuesta IgA, la composición de la microbiota y los signos de lupus.	189
DISCUSIÓN	197
CONCLUSIONES	215
CONCLUSIONS	217
BIBLIOGRAFÍA	219

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una serie de alteraciones que llevan a la pérdida de la tolerancia inmunológica central y periférica. Como consecuencia, se da una activación y diferenciación de clones de linfocitos con reactividad hacia autoantígenos. Además, de forma concomitante al escape de células B y T autorreactivas, las células del sistema inmunitario innato presentan malfuncionamientos que contribuyen a la exposición de autoantígenos, la formación y depósito de inmunocomplejos y, en última instancia, al daño multiorgánico. Dentro de esta desregulación, los pacientes de LES se caracterizan por presentar una mayor tasa de activación de TLR7 por autoantígenos de ARN y la elevadas cantidades de IFN tipo I y II, los cuales contribuyen al cuadro de autoinmunidad. La prevalencia mundial de esta enfermedad es de 43.7 por cada 100.000 personas, donde 9 de cada 10 pacientes son mujeres en edad fértil. A pesar de este marcado sesgo de sexo en los pacientes, los mecanismos que llevan a la pérdida de la modulación de la respuesta inmunitaria en esta enfermedad son, actualmente, desconocidos.

El LES es una enfermedad compleja donde factores genéticos y ambientales contribuyen a su establecimiento. Entre ellos, el gen *Bank1*, altamente implicado en la activación de células B y en la transducción de la señal de TLR7, se ha identificado como un gen de susceptibilidad en el desarrollo del LES. Se ha visto en modelos murinos de lupus que su eliminación del fondo genético induce un fenotipo más moderado de la enfermedad. En paralelo, la microbiota es un factor ambiental de creciente importancia en la investigación de enfermedades autoinmunes debido a su alta capacidad de modulación de la respuesta inmunitaria.

Con el objetivo de evaluar la contribución de la composición de la microbiota intestinal y de la señalización de BANK1, este trabajo se ha dividido en dos partes principales. Por un lado, se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de las manifestaciones sistémicas mediadas por la sobreexpresión del receptor TLR7 (ratones TLR7Tg) para evaluar la validez de este modelo para el estudio de lupus en ratones. Para ello se caracterizaron los niveles de autoanticuerpos con reactividad frente al ADNdc, el daño renal y la esplenomegalia desarrollada por estos ratones, encontrándose una severidad significativamente mayor que en sus controles sin lupus (WT). Beneficiándonos de este modelo, se amplió el conocimiento disponible en la literatura y se caracterizaron las alteraciones intestinales inducidas como consecuencia de la activación excesiva de TLR7 en estos ratones. Se pudo así comprobar que el establecimiento de autoinmunidad a nivel sistémico inducía a nivel intestinal una marcada activación inmunitaria en los centros germinales de las Placas de Peyer, junto con un incremento en la permeabilidad intestinal mediado por cambios en el patrón de expresión y localización de las proteínas claudina-1 y ocludina. Junto con estas modificaciones se dio también en el intestino de ratones TLR7Tg una alteración de la respuesta de células B productoras de IgA y cambios en la composición de la microbiota que, de forma conjunta, permitieron la sobrecolonización de *Bacteroides acidifaciens*. Esta bacteria, además, presentó reactividad cruzada con los autoanticuerpos específicos del ADNdc.

La segunda parte de este trabajo se basó en la evaluación de la contribución del gen *Bank1* a la severidad de las manifestaciones inducidas por la activación de TLR7. Gracias al uso del modelo descrito en la primera parte y el modelo agudo de administración del agonista de TLR7 IMQ, se pudo comprobar que en ausencia de este gen, la sobreactivación de TLR7 induce menores grados de esplenomegalia, daño renal, autoanticuerpos anti-ADNdc y una menor permeabilidad intestinal, con un patrón de localización de claudina-1 similar al encontrado en ratones sanos. Además,

la eliminación de este gen indujo una modificación de la composición de la microbiota intestinal, permitiendo la colonización diferencial de *Parabacteroides distasonis*. El efecto de esta bacteria se evaluó mediante su transferencia al intestino de ratones WT con lupus usando dos modelos independientes. Los resultados conjuntos de ambos mostraron que los ratones WT que poseían *P. distasonis* como parte de su microbiota intestinal presentaban, de forma conjunta, una menor gravedad en las manifestaciones de la estimulación de TLR7, presentándose como una fenocopia de los ratones deficientes para *Bank1*.

Por último, en este trabajo se ha propuesto como mecanismo de actuación de *P. distasonis* una mayor capacidad de inducción del fenotipo B regulador en las células B intestinales. Estas células modulan la respuesta inmunitaria disminuyendo la actividad de células T efectoras e inhibiendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias, siendo así potenciales mediadores claves en el manejo de las respuestas autoinmunes.

De forma global, este estudio proporciona una explicación plausible para la influencia del fondo genético en el fenotipo observado en este modelo murino de lupus. El desarrollo de los procesos de autoinmunidad en humanos incluye numerosos factores de variabilidad que dificultan la extrapolación de este tipo de asociación a la clínica, pero este podría ser el primer paso en el desarrollo de nuevas terapias basadas en la modulación de la microbiota como enfoque complementario a las terapias biológicas.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by a series of alterations that lead to central and peripheral immune tolerance loss. Consequently, phenomenon of activation and differentiation of lymphocytic clones with reactivity towards self-antigens can be found in SLE patients. Concomitantly to the escape of autoreactive B and T cells, other cellular subsets from the immune system exhibit malfunctions that contribute to self-antigen exposure, immunocomplex formation and deposition, and, ultimately, multiorgan damage. Within this dysregulation, SLE patients are characterized for presenting a higher activation rate of TLR7 by ARN autoantigens and high levels of type I and II IFN, which contribute to the autoimmune phenotype. The global prevalence of this disease is 43.7 per 100.000 people, where 9 out of 10 patients are women of reproductive age. Despite this marked sex bias in patients, the mechanisms leading to the loss of immune response modulation in this disease are currently unknown.

SLE is a complex disease in which genetic and environmental factors interplay and contribute to its establishment. Among them, the *Bank1* gene, which is highly involved in B cells activation and in TLR7 signal transduction, has been identified as a susceptibility gene in SLE development. In lupus murine models, it has been observed that *Bank1* deletion from the genetic background induces a less severe disease phenotype. Besides that, microbiota is an environmental factor of increasing importance in the research of autoimmune diseases due to its high modulation capacity of the immune response.

Aiming to evaluate the contribution of gut microbiota composition and BANK1 signaling, this work has been divided into two main parts. Initially, a comprehensive characterization of systemic manifestations mediated by TLR7 receptor overexpression (TLR7Tg mice) was carried out to assess the viability of this murine model for the study of SLE. For this purpose, levels of autoantibodies with reactivity to double-stranded DNA were characterized, as well as renal damage and splenomegaly developed by these mice, finding a significantly greater severity than the observed in control mice without lupus (WT). Benefiting from this model, we extended previous knowledge and characterized gut alterations induced as consequence of the excessive activation of TLR7 in these mice. It was thus confirmed that establishment of autoimmunity at systemic level induced a marked immune activation in the germinal centers of Peyer's patches at gut level, along with an increase in the gut permeability, mediated by changes in the expression patterns and localization of claudin-1 and occludin proteins. Simultaneously, TLR7Tg mice presented an alteration in the IgA-producing B cell gut response and changes in the microbiota composition, which allowed over colonization of *Bacteroides acidifaciens*. This taxon also presented cross-reactivity to double-stranded DNA specific autoantibodies.

The second half of this work was focused on the evaluation of *Bank1* gene contribution to the severity of the manifestations induced by TLR7 activation. For that, we used the model described in the first section of this work, and the acute model induced by TLR7 agonist (or IMQ) administration. The usage of both models proved that, in absence of *Bank1*, TLR7 overactivation induces lower degree of splenomegaly, renal damage, anti-dsDNA autoantibodies and lower gut permeability, with a claudin-1 localization pattern similar to that found in healthy mice. Besides, elimination of this gene induced a modification of the gut microbiota composition, allowing differential colonization of *Parabacteroides distasonis*. The effect of this bacteria was evaluated by

its transferring into the gut of WT lupus mice, using two independent models. The combined results showed that WT mice that presented *P. distasonis* as part of their gut microbiota presented, collectively, reduced severity in the manifestations of TLR7 stimulation, presenting as a phenocopy of *Bank1*-deficient mice.

Finally, in this work it has been proposed that *P. distasonis* action mechanism involves an increase in the induction of the B regulatory phenotype in intestinal B cells. This cellular subset modulates the immune response decreasing the activity of effector T cells and inhibiting the synthesis of proinflammatory cytokines, thus being potential key mediators in the management of autoimmune responses.

Overall, this study provides a plausible explanation for the influence of the genetic background on the observed phenotype in this murine model of lupus. The development of autoimmune diseases in humans includes numerous variability factors that hamper the extrapolation of this type of associations to the clinic, but this could be the first step in the development of new therapies based on microbiota modulation as a complementary approach to biological therapies.

ABREVIATURAS

ABC	Células B asociadas al envejecimiento (<i>Age-associated B cells</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleiúco
ADNdc	ADN de doble cadena
Akt	Quinasa de serina/treonina
ANA	Anticuerpos antinucleares (<i>Antinuclear antibodies</i>)
ANCOM	Análisis de composición de microbiomas
ANDcd	ADN de cadena simple
ARN	Ácido ribonucleiúco
ARNcd	ARN de doble cadena
ARNcs	ARN de cadena simple
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
AUC	Área bajo la curva (<i>Area under the curve</i>)
BAFF	Factor activador de células B (<i>B-cell activating factor</i>)
BANK1	Proteína de andamiaje con repeticiones de ankirina tipo 1 (<i>B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1</i>)
BCR	Receptor de célula B (<i>B cell receptor</i>)
BLK	Quinasa de linfocito B (<i>B lymphocyte kinase</i>)
Breg	Células B reguladoras
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>Bovine seroalbumin</i>)
CD(s)	Célula(s) dendrítica(s)
CDc	Células dendríticas convencionales
CDp	Células dendríticas plasmocitoides
CGs	Centro(s) germinal(es)
ConA	Concanavalina A
CPA	Célula presentadora de antígenos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FcyR	Receptor de la fracción constante γ
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)

GF	Ratones estériles (<i>germ free</i>)
GZMB	Granzima B
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>)
ICs	Inmunocomplejo(s)
ICX	Inactivación del cromosoma X
IFN-I	Inteferón de tipo 1
IFN-II	Interferón de tipo II
ILFs	Folículos linfoides aislados (<i>Isolated lymphoid follicles</i>)
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRF	Factores reguladores de la respuesta al IFN (<i>Interferon regulatory factors</i>)
ISG	Genes característicos de la firma del IFN (<i>Interferon signature genes</i>)
KO	eliminación de un gen (<i>knock out</i>)
LEfSe	análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto (<i>Linear discriminant analysis effect size</i>)
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisacárido
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos (<i>Microorganism-associated molecular patterns</i>)
MFI	Intensidad media de fluorescencia (<i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>Major histocompatibility complex</i>)
mLN	Ganglios linfáticos mesentéricos (<i>mesenteric lymph nodes</i>)
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos (<i>Neutrophil extracellular traps</i>)
NZB	New Zealand Black
NZM	New Zealand Mixed
NZW	New Zealand White
OTUs	Unidades taxonómicas operacionales (<i>operational taxonomic units</i>)
PAS	Ácido peryódico-Schiff (<i>Periodic acid Schiff</i>)
pb	pares de bases
PBL	Linfocitos de sangre periférica (<i>Peripheral blood lymphocytes</i>)

PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripehral blood mononuclear cells</i>)
PCA	Análisis por componente principiapl (<i>Principal component analysis</i>)
PDL1	Ligando de muerte programada 1 (<i>Programmed death-ligand 1</i>)
PERMANOVA	Análisis multivariado de permutaciones (<i>Permutational multivariate analysis of variance</i>)
PFA	Paraformaldehído
PLCg2	Fosfolipasasa C gamma 2 (<i>Phospholipase C gamma 2</i>)
PMA	Formol-12-miristato-13-acetato
PNA	Agglutinina de cacahuete (<i>Peanut agglutinin</i>)
PPs	Placa(s) de Peyer
SCFAs	Ácido(s) graso(s) de cadena corta (<i>Short chain fatty acids</i>)
SFB	Bacterias segmentadas filamentosas (<i>Segmented filamentous bacteria</i>)
SILP	Lámina propia del intestino delgado (<i>Small intestine lamina propria</i>)
SOM	Mapa de organización de poblaciones no supervisado (<i>self-organizing map</i>)
SPF	Condiciones libres de patógenos específicos (<i>Specific pathogen free</i>)
STL	Lectina de <i>solanum tuberosum</i> (<i>solanum tuberosum lectin</i>).
Treg	Célula T reguladora
TCR	Receptor de célula T (<i>T cell receptor</i>)
Tfh	T colaboradora folicular (<i>T follicular helper</i>)
Th	T colaboradora (<i>T helper</i>)
TJ	Uniones estrechas intercelulares (<i>Tight junctions</i>)
TLR	Receptor de tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
UFC	Unidades formadoras de colonias
WGA	aglutinina de germen de trigo (<i>Wheat germ agglutinin</i>)
WGS	Secuenciación metagenómica (<i>Whole genome sequencing</i>)
WT	Ratones no modificados genéticamente (<i>wild type</i>)
Yaa	Acelerador de autoinmunidad ligado al cromosoma Y (<i>Y-linked autoimmune accelerator</i>)

1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Las enfermedades autoinmunes son procesos patológicos caracterizados por la activación del sistema inmunitario frente a componentes celulares presentes de forma ubicua en individuos sanos. Dentro de ellas, el lupus eritematoso sistémico (LES), es una enfermedad caracterizada por una pérdida de la tolerancia inmunitaria central y periférica. En la regulación de la respuesta inmunitaria, la tolerancia ejerce un papel fundamental al controlar la eliminación de las células T y B capaces de reconocer moléculas propias mediante procesos de selección negativa. El escape de linfocitos autorreactivos de estos puntos de control lleva a su activación y proliferación y, en el caso de las células B, a la secreción de autoanticuerpos¹⁻³.

El LES es una enfermedad altamente heterogénea, en gran parte debido a la falta de criterios diagnósticos específicos⁴. De forma clásica, el diagnóstico se ha basado en criterios inmunológicos definidos a partir de observaciones clínicas, los cuales, aunque útiles, presentan limitaciones muy notables⁵. Los criterios diagnósticos definidos por la *European League Against Rheumatism* (EULAR) y el *American College of Rheumatology* (ACR) en 2019 han permitido una clasificación más temprana y precisa del LES al incluir como criterio diagnóstico la especificidad de los autoanticuerpos séricos⁶. No obstante, no se dispone aún de tratamientos o fármacos capaces de evitar la progresión de los casos tempranos hacia formas graves de la enfermedad.

Esta enfermedad se manifiesta en ciclos de remisión y recaída (periodos también conocidos como brotes), y presenta un sesgo de sexo muy marcado, donde 9 de cada 10 pacientes son mujeres en edad fértil. Además de una mayor incidencia, las pacientes de sexo femenino tienen brotes más frecuentes y, en general, una peor prognosis,

siendo el LES una de las causas más comunes de muerte en mujeres jóvenes independientemente de su ascendencia, etnia o cultura⁷⁻⁹.

1.1. Fisiopatología

En los pacientes de LES se han descrito una alta variedad de alteraciones en la respuesta inmunitaria, incluyendo una señalización aberrante de los receptores de células B y T (BCR y TCR, respectivamente, del inglés *B cell receptor* y *T cell receptor*), producción excesiva de citoquinas proinflamatorias y malfuncionamiento de la señalización por receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*)¹⁰.

Dentro de estas alteraciones, las más extendidas entre las células inmunitarias son la señalización anómala de TLR7 y la secreción exacerbada de interferón de tipo I y II (IFN-I, IFN-II). Esta prevalencia se debe a la ubicua expresión del receptor TLR7 y la capacidad de producir IFN-I e IFN-II por la gran mayoría de las células del sistema inmunitario, tanto innato como adaptativo.

TLR7 es un receptor constitutivo de células del sistema inmunitario innato y adaptativo altamente implicado en la respuesta frente a virus. Su activación está mediada por el reconocimiento de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple (ARNcs)¹¹ e induce, aguas abajo, una señalización por Myd88 y la familia de quinasas MAPK que lleva a la translocación del factor de transcripción NK-κB al núcleo. De forma conjunta, esta señalización aumenta la secreción de citoquinas proinflamatorias, mayormente las pertenecientes a la superfamilia del IFN-I¹².

En el LES, la señalización por TLR7 se encuentra incrementada debido a varios factores. Por un lado, se ha visto en algunas cohortes que los pacientes de LES presentan en sus endosomas una mayor expresión de TLR7¹³. Este hecho aumenta la susceptibilidad de interacción con ARNcs de células propias, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad.

El otro rasgo característico de esta enfermedad es la producción de cantidades muy elevadas de IFN-I e IFN-II en comparación con individuos sanos¹³. Aunque ambos grupos de citoquina son cruciales en la mediación de una respuesta proinflamatoria, trabajos recientes han resaltado la importancia del IFN- γ , perteneciente al IFN-II, en la inducción de la expresión de TLR7 en múltiples poblaciones inmunitarias, retroalimentando así este mecanismo de autoinmunidad^{13,14}.

A pesar de que el LES se caracteriza por otras muchas alteraciones en las vías de señalización y transducción celular inmunitaria, la sobreactivación de la respuesta del IFN y TLR7 son los principales responsables del ambiente proinflamatorio y el fenotipo exhausto observado en los pacientes¹⁵.

A continuación, se detallan los fenotipos encontrados en las células mediadoras de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa que, de forma sinérgica, contribuyen a los mecanismos subyacentes del LES.

1.1.1. Alteraciones en la respuesta inmunitaria innata

La señalización anómala por TLRs y las altas concentraciones de IFN que caracterizan esta patología inducen en las células del sistema inmunitario innato un estado que favorece la pérdida de la tolerancia inmunológica a nivel central y periférico, así como la amplificación de la inflamación y el daño tisular¹⁰. Las poblaciones más afectadas en el sistema inmunitario innato de pacientes de LES son las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos.

1.1.1.1. Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son las principales células presentadoras de antígenos (CPAs) y juegan un papel clave en el LES al actuar de nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa¹⁶.

El efecto proinflamatorio de esta subpoblación está mayormente mediado por la producción excesiva de IFN-I e IFN-II, principalmente por las células dendríticas plasmocitoides (CDp) y convencionales (CDc), en respuesta a la estimulación de TLR7 y TLR9 por ARN y ácido desoxirribonucleico (ADN), respectivamente. La secreción de IFN- γ promueve la diferenciación de células B hacia plasmablastos de vida corta productores autoanticuerpos contra el ADN de doble cadena (ADNdc)¹⁷⁻¹⁹ y el reclutamiento de células inflamatorias y autorreactivas²⁰. En los pacientes de LES, además, la elevada concentración de autoanticuerpos IgG estimula y la interacción con su receptor de la fracción constante (Fc γ R) induce en las CDc un estado de hiperactivación y elevada capacidad de migración hacia los ganglios linfáticos, donde incrementan la activación de células T y B²¹⁻²³.

1.1.1.2. Macrófagos

Los pacientes de LES presentan alteraciones en el estado de activación de los monocitos circulantes y macrófagos residentes en tejidos²⁴. Estas anomalías se han relacionado con la fisiopatología del LES al observar que la depleción de monocitos y macrófagos atenúa las manifestaciones del LES en la piel y el riñón²⁵.

Dentro de las desregulaciones características de los macrófagos de pacientes de LES se encuentran la reducción de la capacidad de fagocitosis²⁶ y la alteración del ratio de polarización hacia macrófagos M1 sobre M2²⁷. Además, los altos niveles de IFN-I e IFN-II circulantes incrementan la capacidad de adhesión y acumulación de los macrófagos en los tejidos afectados por el depósito de inmunocomplejos (ICs)^{28,29}, un fenómeno que se ha propuesto como promotor de fibrosis y proliferación celular glomerular³⁰.

Conjuntamente, estas alteraciones, llevan a una acumulación de células apoptóticas que no se eliminan y, por tanto, contribuyen a la exposición de autoantígenos³¹ y formación de ICs.

1.1.1.3. Neutrófilos

En el contexto del lupus, se ha visto que los neutrófilos presentan una mayor capacidad de agregación, menor capacidad fagocítica y una mayor muerte celular que cursa con apoptosis defectiva y necrosis^{32,33}. Además, estas células se caracterizan por tener una elevada tasa de formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés, *Neutrophil extracellular traps*), con alto contenido en autoantígenos nucleares que inducen la formación de ICs³². Las NETs inducen la activación de células plasmáticas autorreactivas y promueven en las CDp la secreción de IFN-I³⁴, lo cual retroalimenta la activación y muerte de neutrófilos e incrementa así la formación de otras NETs. Estos fenómenos generan, de forma conjunta, un ciclo proinflamatorio que contribuye al proceso de autoinmunidad³⁵.

1.1.2. Alteraciones en la respuesta inmunitaria adaptativa

El signo clásico dentro de las disregulaciones del sistema inmunitario adaptativo en el LES es la producción de autoanticuerpos antinucleares (ANA, del inglés *Anti-nuclear autoantibodies*). Sin embargo, esta no es la única alteración descrita en la fisiopatología de respuesta adaptativa. A continuación, se detallan las irregularidades presentes en células B y T.

1.1.2.1. Células B

Durante el desarrollo de las células B, los precursores celulares no activados (denominados *naïve*) de esta población son sometidos a procesos de eliminación clonal, edición del receptor e inducción de un estado de anergia para asegurar que solo las células con reactividad hacia lo potencialmente peligroso llegan a completar su proceso de maduración³⁶. Este proceso no es infalible, y se ha visto que un porcentaje ínfimo de células B maduras es capaz de reconocer autoantígenos en individuos sanos³⁷. En el LES, estos procesos fallan de forma notable, por lo que los pacientes se

caracterizan por tener en circulación clones de células B capaces de activarse frente a autoantígenos y altas concentraciones de ANAs.

Aunque los autoanticuerpos son un signo característico del LES, desde hace décadas ha sido difícil identificar las rutas celulares responsables de la activación y diferenciación de células plasmáticas patogénicas que los producen en humanos. En homeostasis, el primer paso para el inicio de una respuesta inmunitaria adaptativa es la generación de plasmablastos de vida corta y baja afinidad por vía extrafolicular (respuesta T-independiente). Seguidamente, estas células pueden entrar en los centros germinales (CG), donde realizan interacciones iterativas con células T CD4⁺ con especificidad por el mismo antígeno que inducen una maduración de afinidad (respuesta T-dependiente). Completado este paso, las células seleccionadas positivamente entran en circulación sistémica y migran hasta los nichos de supervivencia, donde se establecen como células plasmáticas de vida larga al perder la expresión de B220³⁸. En este proceso, la observación de que un gran porcentaje de los clones productores de ANAs presentan hipermutación somática sugiere que tienen origen mayor, aunque no exclusivamente, de forma T-dependiente³⁹. Esta afirmación se sustenta en el hecho de que la patología del LES exhibe una alta tasa de formación espontánea de CG⁴⁰ mediada por IFN- γ ⁴¹ en humanos y en modelos de ratón. Sin embargo, estudios en ratones con sobreexpresión transgénica del factor activador de células B (BAFF, del inglés *B-cell activating factor*)⁴² y en el modelo de lupus MRL/lpr⁴³ han demostrado fenómenos de activación e hipermutación somática de células plasmáticas autorreactivas en localizaciones extrafoliculares.

En paralelo, la gran mayoría de autoanticuerpos presentes en el LES reconocen autoantígenos nucleares, incluyendo moléculas de ADN, ARN e histonas. Debido a que los TLRs presentan una señalización anómala en los pacientes y sus dianas son, precisamente, estos epítomos nucleares, dichos receptores surgen como potenciales

instigadores de la respuesta autoinmune. Además, la activación combinada del BCR y los TLRs induce una robusta activación de la célula B⁴⁴. Como consecuencia, se ha propuesto que la señalización combinada a través del BCR y los TLRs puede promover la pérdida de tolerancia en las células B y resultar en la formación de ICs circulantes que a su vez estimulan a otras líneas celulares a producir y secretar citoquinas proinflamatorias⁴⁵.

Además de su papel en la producción de anticuerpos, las células B tienen la capacidad de actuar como CPAs por medio de los complejos principales de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de tipo I y II. Mediante esta vía, las células B pueden presentar péptidos de baja afinidad o resultantes del metabolismo proteico a las células T, induciendo así su activación⁴⁶. En el modelo murino de lupus MRL/lpr se ha visto que la nefritis intersticial y la actividad de células T es dependiente de la presencia de células B e independiente de la síntesis de autoanticuerpos, resaltando la importancia de la presentación de antígenos por las células B^{47,48}.

Por otra parte, las células B de los pacientes de LES no solo muestran alteraciones funcionales, sino que presentan también un desequilibrio en su desarrollo. Los estudios sobre la genética de la enfermedad han demostrado que los alelos de riesgo inducen una menor señalización del BCR y CD40, así como alteraciones en la función de la enzima Akt (quinasa de serina/treonina) en la señalización celular que promueven la expansión de células B memoria^{49,49}. En pacientes de LES y en la población sana que presenta autoanticuerpos nucleares se ha descrito una correlación entre los niveles de células B memoria y la concentración de ANAs⁵⁰, sugiriendo un posible vínculo patogénico.

En conclusión, se ha hecho evidente que las células B juegan un papel central y multifacético en el desarrollo del LES, con diferentes funciones más allá de la producción de autoanticuerpos.

1.1.2.2. Células T

El patrón de desregulaciones que se observan en las células T en el LES implica alteraciones en número y funcionalidad y lleva, por vía directa o indirecta a la secreción exacerbada de IL-17 y menor frecuencia de T reguladoras (Treg)⁴⁸.

En el contexto del LES, las células T CD4⁺ o T colaboradores (Th, del inglés *T helper*) foliculares (Tfh, del inglés *T follicular helper*) son determinantes en el mantenimiento de los CG en los órganos linfoides secundarios, y su presencia en sangre correlaciona de forma directa con la gravedad de la enfermedad en pacientes y en modelos murinos de lupus^{51,52}. Además, las células Tfh, junto con las células Th productoras de IL-17 (Th17), son las mediadoras clave de la respuesta de autoanticuerpos T-dependiente. La acumulación de ambas subpoblaciones Th en riñones y piel contribuyen notablemente al daño orgánico⁵³⁻⁵⁵. En los pacientes de LES se ha observado un incremento de IL-17 y una concomitante disminución de IL-2 y TGF- β , ambas esenciales para la correcta activación y proliferación de las células Tregs⁵³, lo cual se traduce en un incremento del equilibrio Th17/Tregs. Como resultado, las células Tregs se encuentran en menor número y con un estado deficiente de activación.

La subpoblación de células T CD8⁺, por su parte, presenta una capacidad citolítica reducida en el LES⁵⁶, que tiene como consecuencia una mayor tasa de infecciones en los pacientes.

De forma global, las alteraciones caracterizadas en los compartimentos inmunológicos innato y adaptativo durante el LES indican que la patología del lupus ocurre en tres etapas: 1) las células B autorreactivas escapan de los procesos de

tolerancia mediante múltiples mecanismos y son activadas por células T CD4⁺, para después diferenciarse y secretar autoanticuerpos; 2) la acumulación de autoantígenos por formar parte de ICs o por estar atrapados en NETs, lleva a su sobreexposición, la cual induce la activación de células mieloides, dendríticas y de linfocitos B y T en última instancia; 3) la respuesta inmunitaria sostenida induce daño tisular y orgánico por deposición de ICs y la infiltración de células inmunitarias, que refuerzan y perpetúan la actividad inmunitaria⁵⁷ (**Fig 1**).

1.2. Manifestaciones

A pesar de la gran heterogeneidad que se puede encontrar entre las manifestaciones clínicas en los pacientes de lupus, las afecciones más comunes incluyen lesiones renales, circulatorias (manifestadas como trombocitopenia y anemia), pulmonares (serositis), musculoesqueléticas (artritis) y cutáneas (erupción malar)²⁸ (**Fig. 2**).

En el caso de los pacientes pediátricos, la enfermedad presenta un fenotipo mucho más severo, con mayor incidencia de complicaciones renales, cutáneas y neuropsiquiátricas⁵⁸. En la población global diagnosticada con lupus, la localización y gravedad de las lesiones depende de factores genéticos y ambientales; sin embargo, la contribución genética parece ser mucho más marcada en el LES pediátrico en comparación con los pacientes adultos, lo que indica que, a edades tempranas, los genes de susceptibilidad tienen un papel más preponderante⁵⁹.

Desde su descubrimiento en el año 400 a.C, las manifestaciones cutáneas del LES han sido uno de los rasgos más distintivos en la clasificación de la enfermedad. De esta forma, Hipócrates se refirió al LES por primera vez como '*herpes esthiomenos*' o '*dermatosis corrosiva*'⁶⁰.

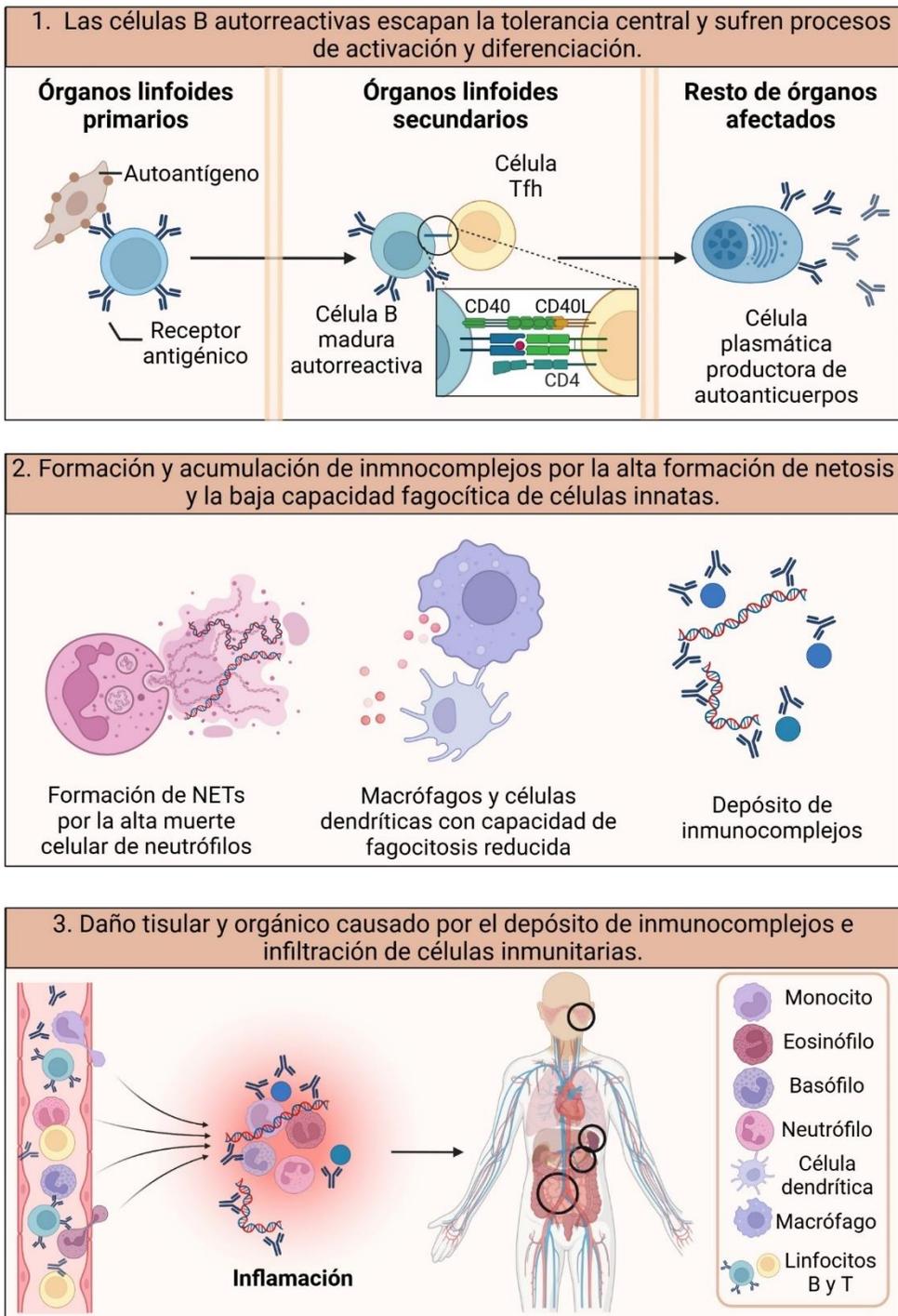


Figura 1. Propuesta de mecanismo del LES postulado en base a los conocimientos disponibles sobre las desregulaciones inmunológicas. Figura realizada con Biorender.

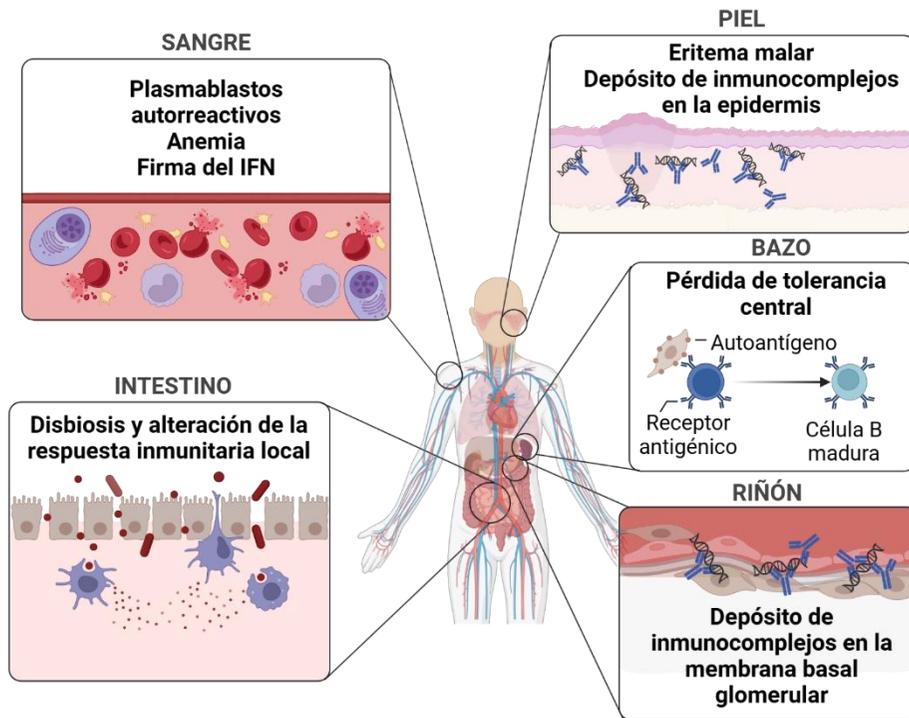


Figura 2. Manifestaciones más comunes entre los pacientes de LES. Figura realizada con Biorender.

Estas lesiones están mediadas por una alta migración de linfocitos T y, en menor medida, B a las capas de la dermis y la epidermis, donde se activan y estimulan la respuesta de autoanticuerpos. Además, las CDc y CDp de la zona son atraídas y secretan elevadas cantidades de IFN-I e IL-6, amplificando así inflamación⁶¹.

En segundo lugar, la nefritis constituye una de las complicaciones más frecuentes del LES que da a los pacientes una peor prognosis y dificulta el manejo farmacológico de la enfermedad⁶². En los casos más avanzados, esta manifestación presenta una alta infiltración en el tejido renal de células NK, linfocitos T CD8⁺, plasmablastos y células B asociadas al envejecimiento (ABCs, de sus siglas en inglés *Age-associated B cells*), todo ello mediado por una alta expresión de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CX3CR1^{63,64}. En este contexto, el depósito de inmunocomplejos en el riñón induce, por

un lado, la migración de macrófagos y células dendríticas que, lejos fagocitar y eliminar dichos IC, incrementan la presentación antigénica a células B autorreactivas y retroalimentan la inflamación local^{65,66}.

Dentro de la sintomatología del LES se incluyen también las afecciones relacionadas con el intestino delgado y grueso. Los pacientes experimentan hinchazón, diarrea, náuseas, vómitos y pérdida del apetito, todo ello con cambios en la composición de la microbiota intestinal. Estos cuadros son, por lo general, manifestaciones de afecciones más graves entre las que se incluyen vasculitis mesentérica, enteropatía por pérdida de proteínas o pseudobstrucción intestinal⁶⁷. Dada la importancia de la respuesta inmunitaria intestinal en este trabajo, este apartado se trata en mayor detalle en los puntos 4 y 5.

1.3. Tratamiento y manejo

El LES es una enfermedad que carece, hasta el momento, de cura. Los fármacos destinados al manejo del lupus han crecido significativamente en los últimos años, ofreciendo a los pacientes opciones más efectivas. En la actualidad, son tratados con fármacos destinados al manejo de la sintomatología y/o con terapias más avanzadas que pretenden modular la respuesta inmunitaria⁶⁸. Sin embargo, existe un alto porcentaje de pacientes para los cuales las terapias actuales son ineficientes.

Tradicionalmente, el manejo del LES se ha basado en antiinflamatorios no esteroideos (AINES), corticoides, hidroxicloroquina e inmunosupresores entre los que destacan la azatioprina, el metotrexato y la ciclofosfamida⁶⁹⁻⁷¹. Todos ellos han mostrado de forma clásica un buen control de los brotes y gran eficacia en manifestaciones graves de la enfermedad, pero a su vez, aumentan la susceptibilidad a infecciones, hipertensión y toxicidad a largo plazo, siendo por ello inadecuados para un uso crónico. Aunque siguen siendo importantes en la actualidad, el enfoque ha evolucionado hacia terapias más precisas.

El anticuerpo monoclonal Belimumab, aprobado en 2011⁷² y dirigido hacia BAFF, marcó un hito al ser el primer tratamiento biológico específico para LES. El uso de este fármaco sentó un precedente para que otros anticuerpos monoclonales se administraran a pacientes de LES, como son el Rituximab⁷³, o el Inebilizumab⁷⁴, ambos dirigidos al bloqueo de células efectoras⁷⁵ y recomendados especialmente en casos de pacientes con enfermedad resistente y alta actividad de autoanticuerpos. Estos tratamientos, aunque efectivos en frenar la progresión de la enfermedad, rara vez inducen remisión⁷⁶, ya que también pueden inhibir rutas implicadas en el mantenimiento de la tolerancia, esenciales en la contención parcial de la enfermedad.

En los últimos 5 años, los avances en estos tratamientos se han centrado en diseñar mecanismos más precisos enfocados en subpoblaciones diana más específicas, como son la inhibición de la señalización de CD40, o el bloqueo de la quinasa de Janus 1 (Jak1) y la tirosina-quinasa 2 (Tyk2)⁷⁷, permitiendo así una mayor refinación en el manejo del lupus. Entre estos destacan Anifrolumab, que bloquea la señalización del IFN de tipo I mediante la unión a su receptor⁷⁸, y Voclosporina, especialmente indicado en pacientes de nefritis lúpica por su eficiencia en el bloqueo de células T mediante la inhibición de la calcineurina^{79,80}.

Uno de los retos terapéuticos más notables en la actualidad son las células plasmáticas autorreactivas de vida larga^{81,82}. La remanencia de estas células en sangre periférica tras la finalización de un tratamiento se asocia con una mayor gravedad en las recaídas subsecuentes, especialmente en lo que respecta a las manifestaciones renales⁸³. Con el objetivo de enfrentar esta y otras limitaciones de las terapias actuales surgen nuevas formas de inmunoterapia, entre las que destacan el uso de células T con receptor antigénico quimérico (CAR, del inglés *Chimeric antigen receptor*) dirigido hacia CD19, la suplementación con IL-2, la administración de células mieloides o la

implementación de nanopartículas recubiertas de citoquinas para la inducción de células Tregs^{84,85}.

2. MODELOS ANIMALES

El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la etiología del LES es complejo debido a la alta heterogeneidad en las manifestaciones y a la compleja combinación de factores que influyen en su predisposición⁸⁶.

Desde finales del siglo XX, el uso de modelos de experimentación ha sido una herramienta importante en la investigación del LES^{87,88}. Gracias a ellos se han realizado numerosos avances en el entendimiento de la patogénesis de la respuesta autoinmune y en la evaluación de la eficacia y toxicidad de diferentes agentes terapéuticos.

Los modelos murinos de lupus se caracterizan por desarrollar, ya sea por una alteración genética o inducido por algún agente externo, un fenotipo que recapitula los síntomas de la enfermedad en los pacientes, incluyendo una desregulación de los linfocitos T y B, la elevada producción de autoanticuerpos y citoquinas proinflamatorias, así como el daño orgánico generalizado⁸⁹.

Los modelos murinos de LES se clasifican en modelos espontáneos, inducidos y humanizados, siendo los dos primeros los más ampliamente utilizados (**Tabla 1**).

2.1. Modelos espontáneos

Los modelos espontáneos se definen como un conjunto de cepas mantenidas de forma endogámica a las cuales se les ha hecho, al menos, una modificación genética que induce el desarrollo de una enfermedad inflamatoria y autoinmunitaria sistémica. Como consecuencia, desarrollan de forma espontánea y progresiva síntomas como nefritis y la producción de autoanticuerpos nucleares.

2.1.1. New Zealand

Algunos de los más importantes son las cepas *New Zealand Black* (NZB)⁹⁰, *New Zealand White* (NZW)⁹¹ y los retrocruces de ambas, creando las líneas NZB/W F1⁹² y *New Zealand mixed* (NZM)⁹³. Descritas originalmente en 1953, el uso de estos fondos genéticos supuso la primera asociación de un modelo de experimentación con los síntomas del LES en humanos.

Uno de los mayores avances conseguidos con estos modelos es la identificación de las tres regiones génicas de susceptibilidad a lupus *Sle1*, *Sle2* y *Sle3*, localizadas en los cromosomas 1, 4 y 7, respectivamente. Estos loci han sido claves en la identificación de la contribución genética durante el desarrollo del LES⁹⁴. La presencia de alelos de riesgo en el locus *Sle1* en el fondo genético B6 es capaz de inducir esplenomegalia leve, incremento en la activación de células B y T y la producción de una gran cantidad de ANAs, pero sin llegar a causar glomerulonefritis⁹⁵. Las variantes genéticas asociadas al LES localizadas en el locus *Sle2* disminuyen el umbral de activación de las células B pero no manifiestan afección renal. Por último, las mutaciones en el locus *Sle3* generan una activación de la respuesta linfoide mediada por hiperactivación de TLRs que afecta a todas las subpoblaciones y es un potente inductor de glomerulonefritis^{96,97}. De los tres, las alteraciones en los genes del locus *Sle1* son las más determinantes a la hora de inducir un cuadro de autoinmunidad severo en presencia de otros alelos de riesgo.

2.1.2. MRL/lpr

Este modelo surge con el cruce de 4 cepas donde la endogamia sostenida indujo la aparición de una mutación espontánea que alteró la expresión del gen *Fas*, el cual controla a su vez la muerte celular y se encarga de mantener bajo control el número de linfocitos en sangre^{98,99}. Como consecuencia, los ratones desarrollan síndrome linfoproliferativo, síntoma que da nombre al modelo, *lpr*, y un cuadro clínico con altos títulos de autoanticuerpos e inmunocomplejos^{100,101}.

Tabla 1. Descripción de los modelos murinos de lupus espontáneos e inducidos con uso más extendido en la investigación del LES. Contenido adaptado de Chen J. et al⁸⁹. Citoqs: alteraciones relativas a la síntesis de citoquinas.

	Modelo	Manifestaciones orgánicas	Vida media (mes)
ESPONTÁNEOS	NZW/B	Linfoadenopatía Esplenomegalia Glomerulonefritis	10-12
	MRL/lpr	Hiper- γ -globulinemia Glomerulonefritis Esplenomegalia	5
	BXSB/Yaa	Hiper- γ -globulinemia Hiperplasia de órganos linfoides secundarios Monocitosis	5-15
	TLR7Tg	Esplenomegalia Glomerulonefritis Hepatomegalia Inflamación pulmonar	8-10
INDUCIDOS	Enfermedad de injerto contra huésped	Esplenomegalia Glomerulonefritis Depósito de inmunocomplejos en vasos	1
	Adm. Pristano	Artritis Capilaritis Nefritis avanzada	0.5
	Adm. IMQ/RSQ	Infiltración esplénica de células mieloides ANEMIA HEMOLÍTICA ESPLENOMEGALIA GLOMERULONEFRITIS	2-4

Caracterización celular		Citoqs
Adaptativo	Innato	
Células B hiperreactivas ↑ T CD4+ ↓ T regs Fallos en la tolerancia central	Activación anormal del complemento ↑ CDs ↑ Macrófagos	↑ IL-6 ↑ TNF- α ↑ IFN-I
Linfoadenopatía de células T y B ↑ T CD4- CD8- Células B hiperreactivas	Hiperactivación del complemento ↑ CDs ↑ macrófagos	↑ IL-6 ↑ TNF- α ↑ IL-1 β ↑ IFN- γ ↓ TGF- β ↓ IL-10
Desregulación de respuesta B Alta sensibilidad a antígenos asociados a ARN	↑ pCDs Hiperactivación del complemento	↑ IFN-I ↑ IFN- γ ↑ IL-6 ↑ IL-23 ↑ IL-12
Células B hiperactivadas Producción excesiva de autoanticuerpos	↑ CDs Hiperactivación del complemento	↑ IL-6 ↑ IFN- γ ↑ IFN-I ↑ TNF- α
Expansión policlonal de células B autorreactivas del receptor Proliferación de células T CD4+ del donante	↑ Actividad presentadora de antígenos de CDs	↑ TNF- α ↑ IL-6 ↑ IFN- γ ↓ IL-10
↑ T CD4+ Células B hiperactivadas autorreactivas con interacción anormal con células T	Alta activación de TLR7, TLR4, TLR2 y TLR9 en CDs y macrófagos	↑ IL-6 ↑ IFN- γ ↑ IFN- α
Poblaciones B y T con un umbral menor de activación	↑ pCDs ↑ macrófagos	↑ IFN- α ↑ IL-6 ↑ IL-12

2.1.3. BXS^B/Yaa

En 1978 se desarrolló el modelo BXS^B¹⁰², una cepa derivada de NZB/W¹⁰³ que permitió la identificación del acelerador autoinmune asociado al cromosoma Y (*Yaa*, por sus siglas en inglés *Y-linked autoimmune accelerator*), el cual interacciona con otros alelos asociados al desarrollo de autoinmunidad para inducir una sintomatología de LES. El locus *Yaa* se compone de 16 genes expresados bajo un promotor que les confiere una expresión superior respecto a la que tienen en condiciones fisiológicas¹⁰⁴, y su estudio asoció, por primera vez el gen de *Tlr7* con la severidad del fenotipo resultante. Así, el uso de este modelo permitió la identificación de *Tlr7* como un gen de susceptibilidad en el desarrollo de LES¹⁰⁵.

2.1.4. TLR7Tg

Tras el descubrimiento del locus *Yaa* y su caracterización en varios modelos de autoinmunidad, la activación desregulada de TLR7 se empezó a asociar al desarrollo de inflamación autoinmunitaria. Como consecuencia surge en 2007 un modelo mediado por la expresión de entre 4 y 32 copias del *Tlr7* en el cromosoma Y, con un incremento de 4-16 veces en los niveles de ARN mensajero (ARNm). Las cepas generadas por la sobreexpresión de este gen, denominadas transgénicas de TLR7, TLR7Tg) presentan, como consecuencia a la variabilidad en el número de copias, diferencias en su sintomatología, pero todas ellas se caracterizan por presentar en grado variable la presencia de ANAs en suero, esplenomegalia, glomerulonefritis, expansión de CD4, hepatomegalia y, solo en el caso de la línea TLR7Tg.6, inflamación pulmonar^{106,107}. La esperanza de vida de estos ratones es de 8 meses¹⁰⁶.

2.1. Modelos inducidos

Los modelos inducidos son particularmente útiles para determinar la contribución de factores genéticos u hormonales de forma aislada en la patogénesis del lupus. Este rasgo es difícil de conseguir en los modelos espontáneos, donde para analizar la

contribución de un gen mediante el uso de una cepa *knock out* (KO), sería necesaria la realización de múltiples cruces con la cepa cuyo fondo genético predispone al desarrollo espontáneo de lupus, consumiendo tiempo y recursos.

En este grupo se encuentran el uso de la enfermedad de injerto contra huésped^{108,109}, la administración de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (TMPD, comúnmente conocido como pristano)^{110,111} y el tratamiento con agonistas de TLR7. Todos ellos se caracterizan por el rasgo común de inducir de forma aguda una respuesta inmunitaria de tipo inflamatoria que se manifiesta de forma muy similar al cuadro clínico de LES en humanos.

Su uso ha permitido numerosos avances en el conocimiento de los mecanismos de activación de TLR7, TLR2, TLR4 y TLR9¹⁰⁷ en el LES, y su aplicación ha sido clave para mejorar el entendimiento sobre la contribución del IFN tipo I y los genes característicos de la firma del IFN tipo I (ISG, del inglés, *Interferon signature genes*)¹¹².

Debido a la importancia de la señalización por TLR7 en este trabajo, se describen a continuación los modelos de administración de agonistas de TLR7.

2.1.1. Administración de agonistas de TLR7

En 2013 surge un nuevo modelo murino de lupus mediado por los agonistas de TLR7 resiquimod (RSQ) e imiquimod (IMQ)¹¹³. La aplicación cutánea de 100 µg de RSQ o 62.5 µg de IMQ siguiendo una cinética de tres veces por semana es capaz de inducir signos de autoinmunidad de intensidad variable en función de la duración del diseño experimental.

Usando este modelo, los ratones presentan una vida media de entre 8 y 15 semanas independientemente del fondo genético y el género (resultados similares en ratones BALB/c o C57BL/6), con importantes signos de esplenomegalia, anemia hemolítica, glomerulonefritis y altos niveles de ANAs¹¹³.

2.2. Modelos humanizados

El uso de modelos de ratón humanizados surge a finales de los años 80 como una posible vía para aumentar la reproducibilidad del cuadro clínico del LES en los modelos de ratón^{114,115} y abordar preguntas imposibles de evaluar en los pacientes por imposibilidad experimental o impedimentos éticos. Para ello, se usan ratones modificados genéticamente para inhibir el desarrollo de células linfoides, generando animales con un sistema inmunitario adaptativo incapaz de montar una respuesta¹¹⁶. En estas condiciones, los ratones son susceptibles de recibir un trasplante de células xenogénicas.

En la mayoría de los casos, los ratones inmunodeficientes son NSG (del inglés, *NOD (Non-Obese Diabetic) SCID (Severe combined Immunodeficiency) Gamma*), o son ratones que han sido genéticamente modificados sobre el fondo genético BALB/c para conseguir la eliminación (*knock out*) de dos genes: *Rag2* y *Il2Rgc*, generándose así los denominados doble *knock out* (DKO): BALB-*Rag2*^{-/-}*Il2Rgc*^{-/-}¹¹⁷.

En este grupo hay principalmente dos tipos de modelos, los basados en la transferencia de células inmunitarias maduras aisladas de pacientes de LES¹¹⁷⁻¹²¹, y aquellos mediados por la transferencia de células troncales hematopoyéticas de individuos sanos seguida del tratamiento con pristano^{88,89}.

3. ETIOLOGÍA DEL LES

El fundamento de la hiperactivación de células B y el reconocimiento de autoantígenos en el LES continúa siendo desconocido. Sin embargo, los estudios con modelos animales y pacientes indican de forma clara que la disrupción de la homeostasis inmunológica es consecuencia de una acción conjunta de factores ambientales y genéticos¹²².

3.1. Genes de susceptibilidad

La alta concordancia en la incidencia de LES entre gemelos monocigóticos pone de manifiesto la existencia de genes de susceptibilidad¹²³. Además, existe una forma rara de LES, denominada 'lupus monogénico', causada por mutaciones en genes individuales, caracterizada por manifestarse a edades tempranas y de forma más severa¹²⁴. Hasta el presente, se han descrito 36 loci para el lupus monogénico, todos ellos relacionados con defectos en la vía del complemento, del IFN, la apoptosis, la regulación de las actividades del proteasoma o con la degradación de ácidos nucleicos^{124,125}.

Gracias a los avances en los estudios de asociación genética se han identificado cientos genes asociados con el desarrollo del LES. En la **Tabla 2** se exponen los más destacados, y se detallan a continuación aquellos con una mayor implicación en este trabajo.

3.1.1. Bank1

El gen *Bank1* codifica la proteína de andamiaje con repeticiones de ankirina tipo 1 (BANK1, del inglés *B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*). Este gen posee 18 exones y está localizado en el cromosoma 4q24 en humanos y en el cromosoma 3g3 en caso de ratones (www.ncbi.nlm.nih.gov). En ambas especies, el gen posee de forma conservada tres dominios: dos motivos de repeticiones similares a ankirina, un motivo de hélice enrollada (CC del inglés, *coiled-coil*) y un motivo Dof-BCAP-BANK (DBB). A nivel proteico se han reportado 3 isoformas en humanos y 2 isoformas en ratón, pero todas contienen hasta 12 tirosinas susceptibles de ser fosforiladas y dos motivos con alto contenido en prolina, lo cual le confieren capacidad de interactuar otras proteínas con dominios SH3 y SH2, respectivamente¹²⁶.

Tabla 2. Genes de susceptibilidad asociados al desarrollo de LES. Se muestra el gen en cuestión, su localización cromosómica, las poblaciones inmunitarias que lo expresan y las rutas celulares en las que están implicados, todo ello junto con las variantes génicas y el papel de protección o riesgo que cada una desarrolla. LLC: leucemia linfocítica crónica.; LES: lupus eritematoso sistémico; AR: artritis reumatoide.

Gen	Localiz.	Expresión	Ruta metabólica regulada
BANK1	4q24	Células B inmaduras, maduras y recirculantes	Potenciación de la señal del BCR Señalización de los TLR e y del IFN-I Inhibición de la activación de Akt inducida por CD40
BLK	8p23.1	Células B inmaduras y maduras. Muy baja en células plasmáticas	Señalización del BCR Diferenciación de células B hacia células plasmáticas
HLA-DQA1	6p21.3	Macrófagos y células dendríticas Baja en células B inmaduras, elevada en células B maduras y baja en células plasmáticas	Presentación de antígenos Activación de células T CD4+
CD38	4p15	Células B inmaduras, maduras y células plasmáticas Células T reguladoras y CD8+ NK, macrófagos y células dendríticas	Proliferación y activación celular mediada por señalización por calcio Señalización del BCR y TCR
TLR7	Xp22.2	Células dendríticas plasmocitoides y convencionales, macrófagos y monocitos Células B activadas y de zona marginal (CGs)	Reconocimiento de ARN de cadena simple Inducción de expresión de citoquinas proinflamatorias y de IFN-I Polarización de células Th1

Variantes asociadas con patologías				Ref
	Variante	Asociación	Enfermedad	
	rs17266594	Protección	LES	127
	rs10516487	Riesgo	LES AR	127
	rs10028805	Riesgo	LES LLC	127,128
	rs13277113	Riesgo		129
	rs4840568	Riesgo	LES	129
	rs2248932	Riesgo		129,130
	HLA-DQA1*03:02	Protección	LES	131
	Posición 182, intrón 1: CC	Riesgo	LES	132
	Posición 418, exón 3: CG	Protección		
	TLR7-Y264H	Riesgo	LES	11
	rs3853839 rs179019 rs179010	Riesgo		133

En humanos se han descrito 4 isoformas, de las cuales hay dos de especial interés en el estudio del LES. Por un lado, la isoforma de la secuencia canónica contiene 785 aminoácidos y se genera por empalme alternativo de los 18 exones, por lo que es conocida como isoforma de longitud completa (FL por sus siglas inglés, *full length*). En paralelo, existe una isoforma de 652 aminoácidos resultado de la eliminación del exón 2 en el empalme alternativo, el cual codifica para un dominio TIR¹³⁴, y que es conocida como Delta2 ($\Delta 2$) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

En 2008, un estudio de asociación a nivel del genoma identificó algunas variantes del gen *Bank1* como variantes de riesgo en el desarrollo del LES¹³⁵. Entre ellas, tres poseen una fuerte asociación: rs17266594, rs10516487 y rs10028805, con un efecto protector para la primera y de riesgo en el caso de las dos últimas. Este hecho se ha confirmado en cohortes independientes europeas¹³⁶, afroamericanas¹³⁷, chinas¹³⁸ y tailandesas¹³⁹. En términos de funcionalidad, la variante protectora rs17266594 se asocia con un incremento en la expresión de la isoforma $\Delta 2$ de BANK1, mientras que las dos variantes de riesgo se asocian con una mayor presencia de la isoforma FL y mayor cantidad de autoanticuerpos anti ADNdc¹⁴⁰. A pesar de que el mecanismo regulador de la expresión del empalme alternativo es desconocido, la presencia de la variante de riesgo rs10516487 ha sido hipotetizada como potenciadora de polimerización proteica, ya que se asocia con la presencia de grandes complejos de proteínas de andamiaje en el citoplasma celular¹⁴¹. Además, se ha podido elucidar que el dominio TIR, ausente en la isoforma $\Delta 2$, está implicado en la interacción de TRAF6 con IRF7 y MyD88 tras la estimulación de TLR7, TLR8 y TLR9^{141,142}, por lo que su ausencia se traduciría en una menor actividad de transducción celular.

De forma similar, numerosos polimorfismos de *Bank1* se han asociado con otras enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple o

esclerosis sistémica cutánea difusa, y cáncer, siendo algunas variantes descritas comunes con las asociadas en LES¹⁴³⁻¹⁴⁵.

BANK1 es una proteína adaptadora expresada mayormente en células B maduras, inmaduras y células B recirculantes, pero no en pro-B ni en pre-B¹⁴⁶. *Per se*, carece de actividad enzimática, pero juega un papel esencial en vías de señalización intracelular al favorecer el acercamiento físico de proteínas transductoras de señales implicadas tanto en la respuesta innata como en la adaptativa^{134,147-149} (Fig. 3).

En localizaciones próximas a la membrana, BANK1 interactúa con la tirosina-quinasa Lyn y la quinasa de linfocitos B (BLK del inglés, *B lymphocytes kinase*), ambas implicadas en la correcta modulación de la señal de activación iniciada por TLRs y/o BCR. La activación del BCR induce también una interacción entre los motivos ricos en prolina presentes en BANK1 y la región SH2 de la fosfolipasa C gamma 2 (PLCg2 del inglés, *Phospholipase C gamma 2*), que a su vez participa en la transformación del diacilglicerol en inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Este mediador ejerce su señalización en la superficie del retículo endoplasmático, donde interactúa con su receptor e induce la movilización de Ca²⁺, regulando así la síntesis de ATP y la actividad de una amplia gama de enzimas^{134,147}. Además, BANK1 es un inhibidor de la activación celular de Akt inducida por CD40, modulando la actividad del factor mTOR^{150,151}.

En la respuesta innata, BANK1 está mayormente implicada en la señalización de la vía del IFN-I. El dominio TIR presente en la isoforma FL de BANK1 es necesario para una correcta síntesis de IFN α como paso final de transducción de la señal de TLR7, TLR8 o TLR9¹⁴¹, al activar el factor de transcripción NF- κ B o factores reguladores de la respuesta al IFN (IRF, del inglés, *Interferon regulatory factors*)¹³⁴. BANK1 también participa en la fosforilación por p38 de MAPK, activándose así la cadena de fosforilación de MNK1/2 y el factor de transcripción eIF4. BANK1 participa también en la fosforilación del heterodímero de IRAK1 e IRAK2 mediada por

IRAK4. La fosforilación del complejo lo vuelve activo y participa en la ubiquitinación de TRAF6, permitiendo así la activación de $I\kappa\kappa\alpha/\beta$. La forma activa de esta proteína permite el secuestro del inhibidor de NK- κ B I κ B, liberando así al factor NK- κ B y permitiendo su translocación al núcleo^{148,149}.

En trabajos con animales de experimentación se ha visto que la eliminación de *Bank1* del genoma induce un incremento en la formación de centros germinales y en la síntesis de IgM en respuesta a antígenos T-dependientes¹⁴⁶, una reducción en la producción de IFN-I, IgG, y citoquinas inflamatorias y una desregulación en el desarrollo de la línea mieloide y linfoide¹⁴⁹.

3.1.2. Tlr7

La señalización de TLR7 en el desarrollo del LES ha sido ilustrada en modelos murinos a través del uso del locus *Yaa*, uno de los inductores de autoinmunidad más potentes donde la sobreexpresión de *Tlr7* juega un papel central¹⁰⁵. Tal es así, que el bloqueo de esta ruta en los ratones BXSB/*Yaa* es capaz de inhibir el desarrollo de gran parte de los síntomas del LES^{106,152-155}.

La sobreexpresión de *Tlr7* por incremento de número de copias es un mecanismo conocido y ampliamente usado en modelos espontáneos de lupus, pero en humanos, esta asociación es controvertida y está altamente influenciada por el resto de las variantes génicas asociadas a las diferentes poblaciones^{155,156}. Curiosamente, en pacientes pediátricos de lupus pertenecientes al sexo femenino se ha observado una fuerte asociación entre el número de copias de *Tlr7* y el desarrollo de la enfermedad, lo que subraya nuevamente la influencia significativa de la genética en este subtipo de LES¹⁵⁷. A pesar de las múltiples asociaciones que se han realizado entre el número de copias de *Tlr7* y/o la expresión a nivel de proteína con el desarrollo del LES, solo se ha identificado hasta la fecha una variante de este gen en humanos que se traduzca en un incremento *in vivo* de la señalización de TLR7¹⁵⁸.

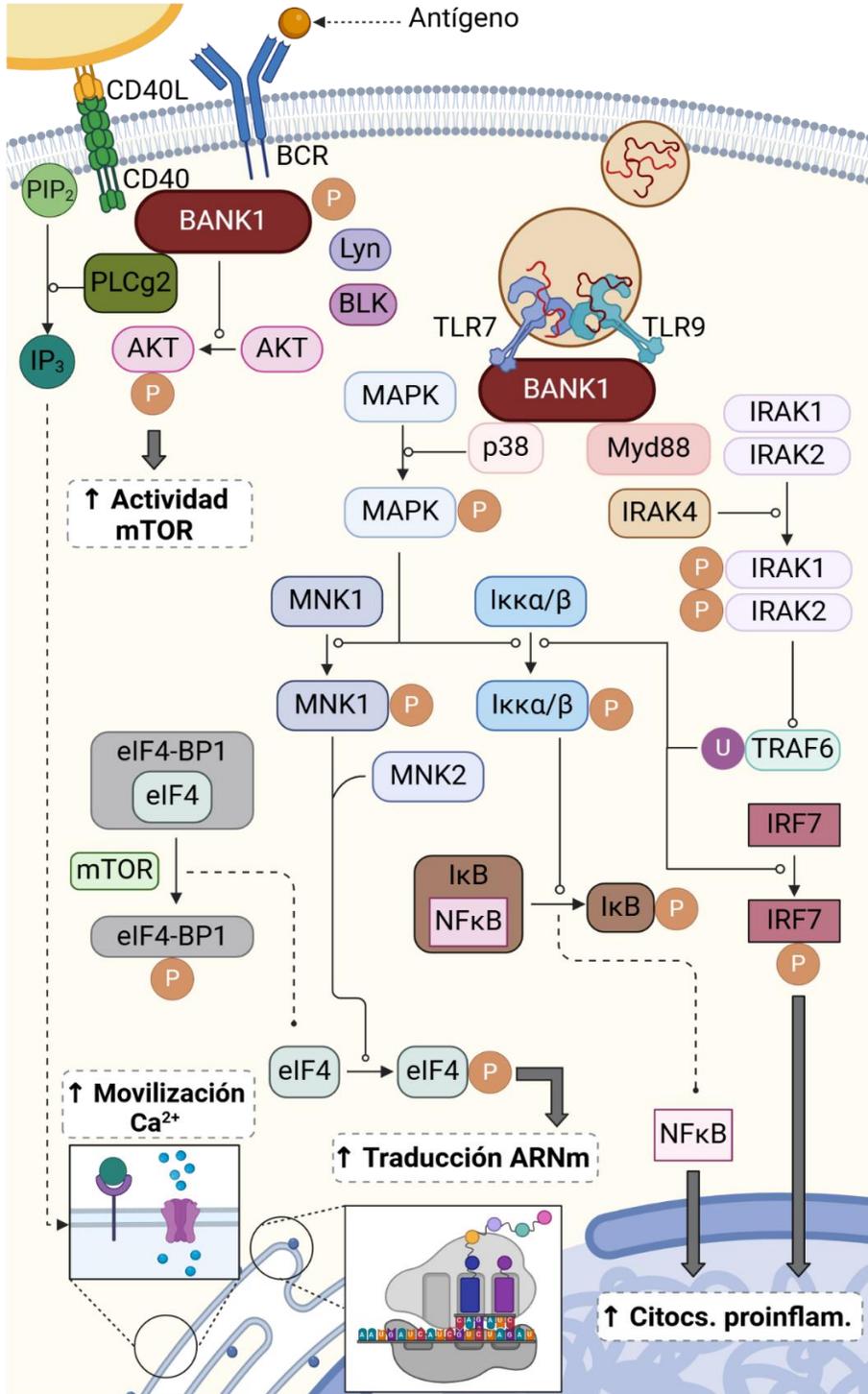


Figura 3. Participación de BANK1 en las vías de señalización de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa en células B. Figura realizada con Biorender.

La variante descrita en humanos induce una ganancia de función en TLR7 que disminuye el umbral de activación de este receptor. A nivel de patología, esta variante promueve la supervivencia de las células B inmaduras activadas por el BCR, las cuales constituyen la principal fuente de clones autorreactivos¹⁵⁹. Este incremento en la supervivencia hace que un mayor porcentaje de clones autorreactivos reciban señales secundarias de activación y proliferación y logren diferenciarse a células productoras de autoanticuerpos.

Los estudios sobre las implicaciones de las mutaciones de *Tlr7* en las células B han permitido encontrar una plausible asociación funcional en aquellos pacientes donde la reactividad de los autoanticuerpos está dirigida a complejos de proteína y ARN. Se ha visto que la sobreexpresión de este receptor limitada al linaje de células B es suficiente para inducir inflamación renal y reclutamiento de linfocitos autorreactivos, sugiriendo que los pacientes que tengan un elevado porcentaje de anticuerpos positivos para estas dianas podrían estar sufriendo un lupus mediado por TLR7 en sus células B¹⁵⁵.

En conjunto, la implicación del gen de *Tlr7* y *Bank1* en los estudios murinos de lupus refleja la importancia de analizar las interacciones sinérgicas que tienen lugar entre la respuesta inmunitaria adaptativa y la innata, donde los genes de susceptibilidad descritos con implicación directa para una de ellas pueden afectar directa o indirectamente a la otra.

3.2. Factores ambientales

Aunque la genética juega un papel crucial en la predisposición del LES, no es suficiente para explicar por completo las complejas desregulaciones inmunológicas que caracterizan a esta enfermedad. Los factores ambientales, en conjunto con la presencia de alelos de riesgo, contribuyen al desarrollo y exacerbación del LES,

aportando una dimensión clave en la etiología multifactorial que caracteriza esta patología.

Como ya se ha mencionado, la epidemiología del LES tiene un sesgo de género muy marcado. En las pacientes de sexo femenino, se han propuesto como posibles explicaciones a este hecho el papel de las hormonas sexuales y la inactivación del cromosoma X (ICX). En primer lugar, las hormonas sexuales regulan el funcionamiento del sistema inmunitario¹⁶⁰ y, dentro de esta funcionalidad, se ha visto en modelos de ratón y estudios con humanos que la exposición al estrógeno puede aumentar el riesgo a desarrollar LES¹⁶¹, mientras que la progesterona y la testosterona parecen jugar un papel protector¹⁶². Curiosamente, aunque no se ha podido establecer una relación causal directa entre las hormonas y el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad, sí se ha visto que afectan directamente a la correcta activación e interacción de las células B en los centros germinales y a la capacidad de las CDp de sintetizar IFN-I¹⁶³. Por otro lado, el cromosoma X contiene gran parte de los genes implicados en la correcta regulación inmunitaria, como son *CXCR3*, *CD40L* o *FOXP3*¹⁶⁴. En condiciones fisiológicas, la ICX no es un proceso 100% eficiente, y hasta un 25% de genes pueden sufrir una expresión alta por la doble dosis génica¹⁶⁵, lo que se ha visto que incrementa hasta 10 veces la susceptibilidad al LES¹⁶⁶.

Además, la radiación ultravioleta, el tabaquismo, así como la infección por el virus de Epstein-Barr, son factores con una relación directa en el desarrollo del lupus, los cuales actúan mediante modulaciones epigenéticas con independencia del sexo del individuo^{167,168}.

Por último, la composición de la microbiota en las diferentes mucosas corporales emerge como un factor ambiental clave en los procesos de autoinmunidad, ganando progresivamente mayor importancia en los últimos años al asociarse el estado de disbiosis con las enfermedades autoinmunes y, en especial, con el LES.

4. MICROBIOTA INTESTINAL

De forma media, el colon de un adulto contiene entre 10^{13} y 10^{14} células microbianas con una alta diversidad, observándose un rango de entre 100 y 400 unidades operacionales taxonómicas (OTUs, del inglés *operational taxonomic units*). A pesar de esta alta variedad, la mayoría de estas bacterias pertenecen a los géneros *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, mientras que el resto de taxones está presente en porcentajes menos notables^{169,170}.

En condiciones basales, la microbiota ayuda en la digestión, el metabolismo, el desarrollo de órganos y la diferenciación de células inmunitarias y neurales. Se ha demostrado también que las bacterias intestinales modulan, de manera directa e indirecta, los procesos tolerogénicos que mantienen bajo control las respuestas inflamatorias^{171,172}. La composición de las poblaciones bacterianas que permiten este equilibrio simbiótico con el hospedador (holobiontes) se conoce como eubiosis, mientras que cuando la composición de la microbiota se modifica y aumenta la abundancia de patógenos oportunistas (patobiontes), se adquiere una condición denominada disbiosis.

4.1. Microbiota y autoinmunidad

La creciente evidencia recopilada en los últimos años relativa a la composición de la microbiota intestinal ha mostrado que la inflamación crónica está asociada con una desregulación del microbioma intestinal, lo cual sugiere la existencia de un vínculo patogénico entre la disbiosis y los fenómenos de autoinmunidad¹⁷³⁻¹⁷⁵. Además, estudios en modelos animales han mostrado de forma clara que la regulación de la microbiota intestinal puede agravar, proteger o modular las manifestaciones fenotípicas del LES¹⁷⁶.

Este efecto se ha demostrado con el uso de modelos con ratones estériles (GF del inglés *Germ free*), los cuales muestran resistencia al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales (IBD por sus siglas en inglés *Inflammatory Bowel Disease*) y autoinmunes. Además, gracias al uso de estos animales se ha podido establecer el efecto de ciertos perfiles de microbiota e incluso la contribución de especies concretas. Algunos ejemplos notables incluyen la inducción de lupus en ratones C56BL/6 GF mediada por la monocolonización de *Enterococcus gallinarum*¹⁷⁷ y de *Lactobacillus reuteri*¹⁷⁸, o el desarrollo de lupus en estos mismos ratones tras un trasplante fecal de la microbiota de ratones con LES establecido¹⁷⁹ o de pacientes diagnosticados con LES¹⁸⁰.

Los estudios a nivel de composición taxonómica de la microbiota en amplias cohortes de pacientes de LES y su comparación con individuos sanos ha mostrado que la patogénesis del lupus va acompañada de una disminución en el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*¹⁸¹⁻¹⁸³. El estudio de la microbiota en el contexto de las enfermedades autoinmunes ha permitido la reformulación de paradigmas clásicamente aceptados. Este es el caso de la implicación de las células Th1 T-bet⁺ como mediadores esenciales en el desarrollo de colitis¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Mediante el uso de un modelo murino, Zimmermann et al.¹⁸⁷ probó que es la composición de la microbiota, y no la expresión de T-bet, lo que determina la capacidad de las células Th1 de inducir colitis, siendo las especies pertenecientes a los géneros *Prevotella* o *Bacteroides* los inductores inflamatorios intestinales más potentes^{188,189}.

Los mecanismos por los cuales la microbiota contribuye al desarrollo y las funciones inmunitarias incluyen la secreción de metabolitos y la expresión de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, del inglés *Microorganism-associated molecular patterns*)¹⁹⁰. Mediante ambos, las bacterias se comunican con las células inmunitarias por contacto celular o señalización endocrina e interactúan con

el resto de las bacterias intestinales, ejerciendo así funciones de control del ecosistema¹⁷¹.

En cuanto a la acción de la microbiota mediada por metabolitos, los principales mediadores identificados son los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, del inglés *Short-chain fatty acids*) y todos los productos derivados del metabolismo del triptófano. Los SCFA han sido reportados como agentes beneficiosos en muchas enfermedades autoinmunes¹⁹¹, pero los estudios sobre el papel de estos mediadores en el LES han arrojado resultados contradictorios¹⁹², lo que sugiere que la regulación inmunológica de estos metabolitos en la patología del lupus responde a un patrón indirecto difícil de determinar. Por otro lado, las bacterias también participan en el metabolismo del triptófano, cuyos productos pueden entrar a circulación sistémica y ejercer funciones inmunomoduladoras¹⁹³. A este respecto, se ha visto en el modelo murino espontáneo de lupus C57BL/6. *Sle1.Sle2.Sle3* que una dieta baja en triptófano es capaz de reducir en estos ratones la severidad de la enfermedad y los síntomas de autoinmunidad¹⁷⁹.

Por último, la evidencia disponible sugiere que la tolerancia a los autoantígenos puede ser alterada por la microbiota siguiendo tres mecanismos. Por un lado, mediante la expresión de ortólogos de autoantígenos en la superficie bacteriana que, por similitud molecular, activan potenciales células B autorreactivas, como es el caso del autoantígeno Ro60 y una amplia variedad de péptidos bacterianos^{194,195}. Por otro lado, pueden darse en los autoantígenos modificaciones post-transduccionales dependientes de la microbiota que se traducen en un aumento de la inmunogenicidad de los mismos¹⁹⁶. De forma adicional, ciertas bacterias comensales pueden translocarse y alcanzar localizaciones sistémicas, lo cual lleva a interacciones aberrantes con células inmunitarias y a la inducción de una respuesta proinflamatoria que puede conllevar una pérdida de la tolerancia¹⁷⁷.

Los mecanismos subyacentes que vinculan la microbiota intestinal y el LES se muestran con más detalle en la **Figura 4**.

Considerando la creciente evidencia que vincula el estado de disbiosis intestinal con el desarrollo del LES, la microbiota surge como un posible área de interés con potencial predictivo para la identificación temprana y la prevención del LES¹⁹⁷. El seguimiento de los perfiles de microbiota en pacientes con LES e individuos sanos ha mostrado que un aumento en la abundancia relativa de *Escherichia fergusonii* junto con una disminución en *Faecalibacterium prausnitzii* incrementa el riesgo de LES¹⁹⁸, lo que sugiere que la flora intestinal puede ser utilizada como un índice de detección dinámica para identificar grupos de alto riesgo en el desarrollo de la patología.

4.2. Regulación de la composición bacteriana

A la luz de la relación existente entre las variaciones en la composición de las poblaciones comensales intestinales y la manifestación y progresión de las enfermedades autoinmunes, es crucial entender los factores que modulan la composición de la microbiota.

La composición del microbioma y el análisis de la estructura se puede analizar desde varios puntos de vista:

I. Composición taxonómica.

El análisis taxonómico a nivel de OTUs se centra en la identificación y cuantificación de los organismos presentes en la microbiota intestinal. Este tipo de análisis se realiza mediante técnicas de secuenciación y proporciona información relativa a la abundancia y diversidad del ecosistema^{199,200}. Los análisis a nivel de especie han permitido la identificación de especies patógenas capaces de inducir una respuesta proinflamatoria¹⁷⁸.

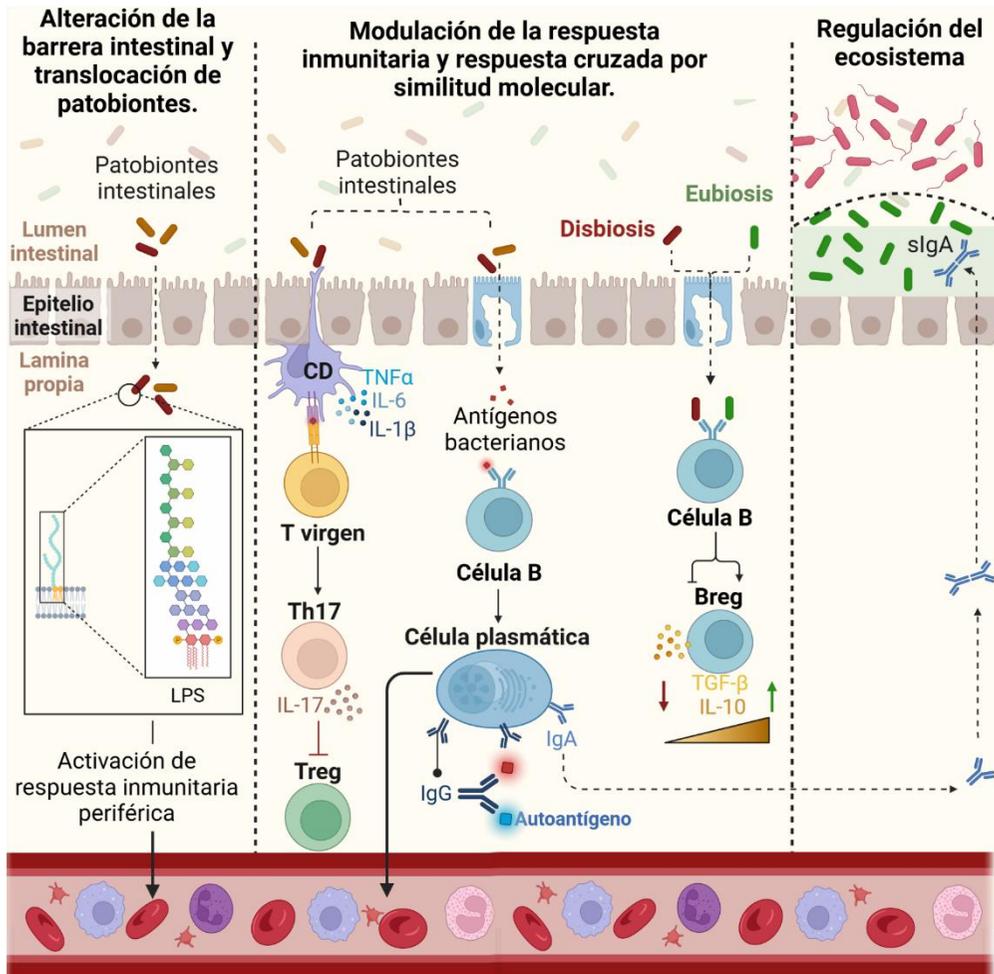


Figura 4. Mecanismos por los cuales la microbiota podría ejercer efectos inmunomoduladores en el contexto del LES. Por un lado, la alteración de la barrera intestinal y la consecuente translocación de bacterias intestinales podría ejercer un fuerte papel de activación inmunitaria descontrolada en la lámina propia intestinal y en localizaciones periféricas. Esta acción puede inducir el incremento de los niveles de autoanticuerpos, la colonización bacteriana de órganos distales y la apoptosis celular en órganos linfoides secundarios. Por otro, ciertos perfiles de bacterias pueden presentar una capacidad más marcada de activación de una respuesta inflamatoria, como es la respuesta Th17. Además, la presencia de estructuras ortólogas en la presencia de las bacterias y su interacción con las células inmunitarias intestinales puede ejercer un papel activador de clones autorreactivos e inducir la secreción de autoanticuerpos. Estos mecanismos inducirían un incremento de la firma de IFN por Sobreactivación de CD y un desequilibrio del fenotipo inmunoregulador. Por último, la respuesta inmunitaria, mediante la secreción de IgA, puede modular la composición de la microbiota, la cual se ha visto que, en situaciones de autoinmunidad, presenta un perfil de disbiosis. Figura realizada con Biorender.

II. Moléculas de superficie con capacidad inmunomoduladora.

Este enfoque describe los ecosistemas desde el punto de vista de los azúcares, lípidos y proteínas que las bacterias expresan en superficie, como el LPS, la flagelina o algunos peptidoglicanos. Este tipo de estructuras son mayormente mediadores de la respuesta innata, pero tienen la capacidad de dar forma a la respuesta adaptativa determinando el perfil de diferenciación de células B y T. A modo de ejemplo, las especies del género *Bifidobacterium* presentan un alto grado de variabilidad en la síntesis, composición y estructura de exopolisacáridos²⁰¹ mediante las cuales inhiben la activación desmesurada de células dendríticas e inducen un fenotipo regulador en células T²⁰². Por ello, la suplementación con bacterias que faciliten la colonización de *Bifidobacterium* spp, o que compartan algunos componentes de superficie podría ser un mecanismo factible para modular la respuesta inmunitaria intestinal.

III. Metabolismo

Por último, este punto de vista se centra en la metabolómica, analizando de forma global el catabolismo que se da en el tracto gastrointestinal y los productos generados, así como todos sus intermediarios. Estos datos informan sobre la contribución de la microbiota a la digestión de nutrientes, producción de energía y síntesis de componentes esenciales para el huésped. De forma adicional, los metabolitos bacterianos pueden absorberse y señalizar en localizaciones periféricas²⁰³. Un perfil de microbiota antiinflamatorio se asocia con mayores producciones de ácidos biliares secundarios, butirato, propionato y polifenoles^{204,205}.

Tanto la composición de especies de la microbiota como el metabolismo de estas pueden ser regulados por factores externos. Entre ellos, los más destacables son los fármacos, la dieta, la exposición a químicos y el estilo de vida.

En primera instancia, dentro de los fármacos, los antibióticos son los factores con mayor efecto en la modificación del microbioma humano, y se ha visto que influyen de forma determinante en la inducción de enfermedades autoinmunes en modelos de ratón²⁰⁶. El contenido en fibra, triptófano o ácidos grasos en la dieta son, por otro lado, factores que hacen de la nutrición otro efecto modulador de la composición de la microbiota. En el contexto del LES se ha visto que se puede modular el perfil antiinflamatorio de la microbiota en un modelo murino mediante la incorporación de almidón resistente en el pienso. Esta modulación cambia el metabolismo global de las bacterias y limita el crecimiento de *Lactobacillus reuteri*, una bacteria asociada con la patogénesis del LES¹⁷⁸.

4.3. Estudio de la composición bacteriana

Los trabajos descritos hasta el momento ponen de manifiesto que las comunidades microbianas juegan un papel activo en el mantenimiento de la salud o la promoción de la enfermedad. Los avances en las técnicas de análisis de microbiota han permitido describir los mecanismos fisiológicos por los cuales las bacterias ejercen su papel modulador en la respuesta inmunitaria del huésped y han permitido analizar el ecosistema desde el punto de vista taxonómico, metabólico y de patrones de moléculas superficie. En la **figura 5** se reflejan las técnicas disponibles en la actualidad para el estudio de la microbiota junto con las ventajas y limitaciones de cada una.

4.3.1. Secuenciación de alto rendimiento (*High-throughput sequencing*)

Desde el desarrollo en 2008 de las técnicas de nueva generación, la secuenciación de alto rendimiento ha permitido la caracterización del microbioma y su

complejidad²⁰⁷. Dentro de estas se distinguen dos variantes, la secuenciación del gen de la subunidad pequeña 16S del ARN ribosomal (ARNr) y la secuenciación metagenómica (WGS, del inglés *Whole Genome Sequencing*).

El gen *16S* constituye un gen exclusivo de mantenimiento de procariontes con nueve secuencias hipervariables (V1-V9) específicas de cada taxón dentro de secuencias altamente conservadas, por lo que su secuenciación permite el estudio de la filogenia y taxonomía bacteriana²⁰⁸. En esta técnica, la región hipervariable seleccionada es amplificada por PCR y el producto de esta reacción es sometido a secuenciación (**Fig. 5A**).

Por su alta resolución y su enfoque rentable, la secuenciación del ARNr 16S se ha convertido en el enfoque más común para el análisis de comunidades microbianas intestinales¹⁷². Dentro de las regiones disponibles, la región V4 ha sido altamente recomendada como el estándar de referencia para la caracterización de la microbiota intestinal humana^{169,209}.

La secuenciación masiva, WGS o secuenciación *shotgun*, proporciona información relacionada con la identidad y la funcionalidad de las poblaciones, lo que permite comprender con más detalle el impacto fisiológico que las bacterias ejercen en el huésped¹⁷². Esta variante implica la fragmentación aleatoria del ADN, la secuenciación de estos fragmentos y, por último, la reconstrucción y ensamblaje de secuencias superpuestas en una secuencia continua²¹⁰ (**Fig. 5A**).

A pesar de que ambas variantes han mostrado una continua disminución en el coste con el desarrollo de nuevos secuenciadores²¹¹, la secuenciación sigue siendo una técnica compleja²¹² y con tendencia a sesgos técnicos^{213,214}.

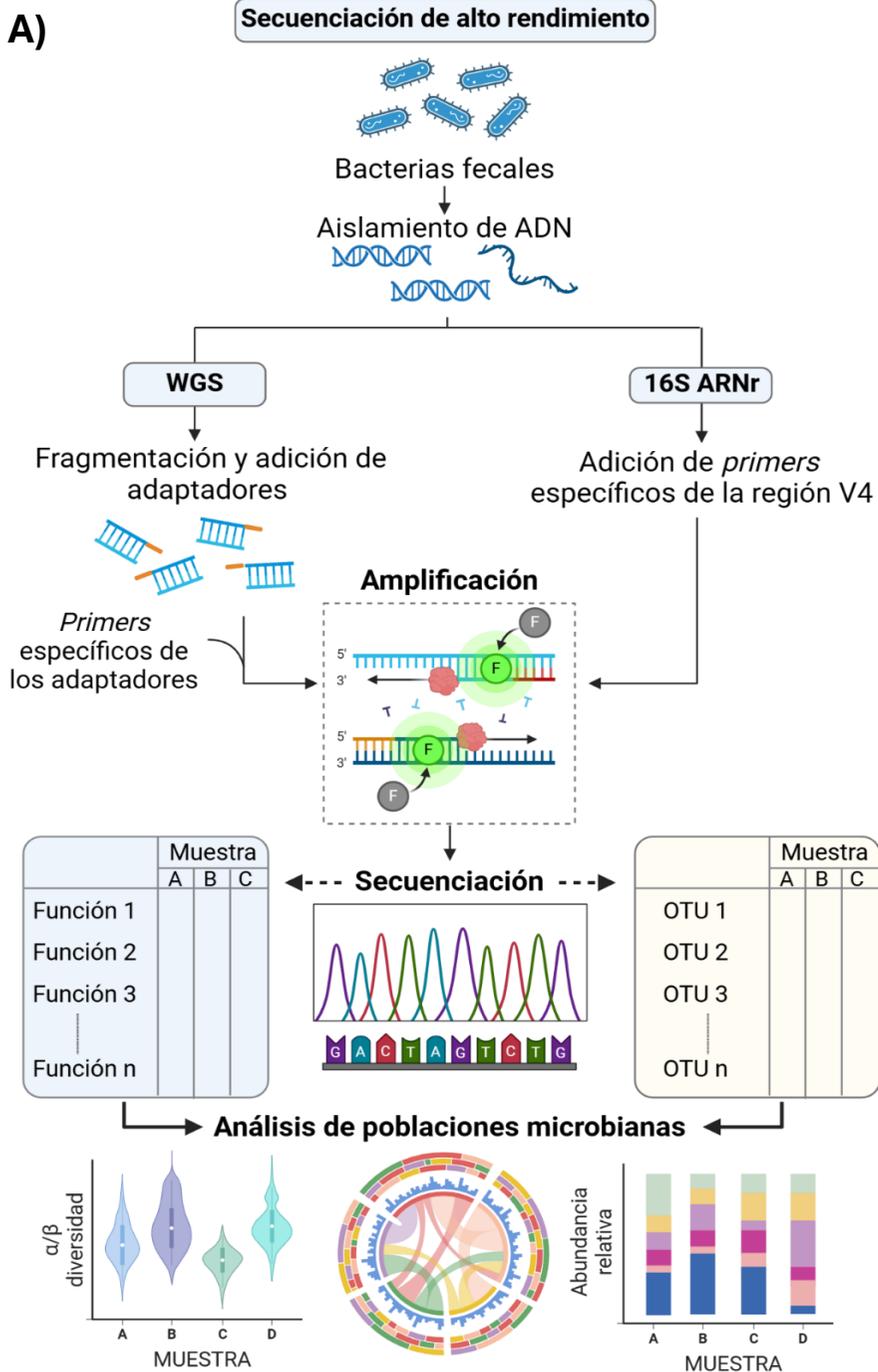
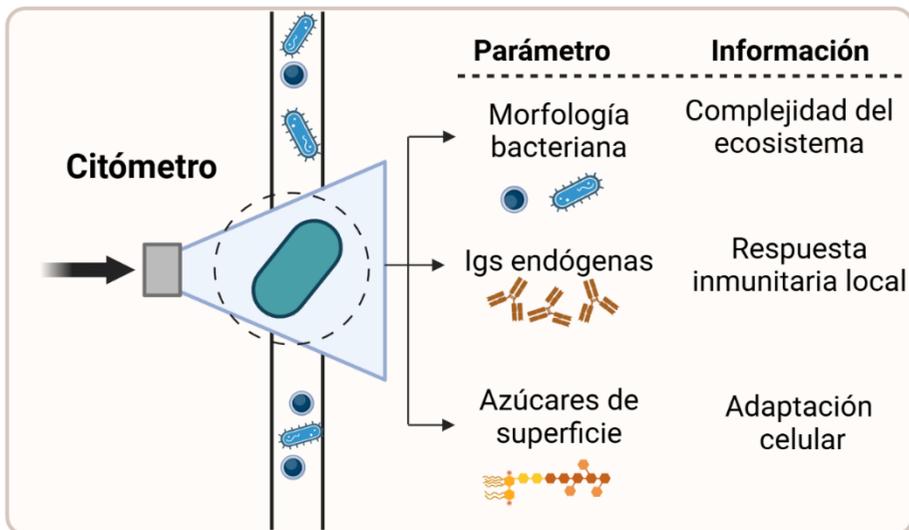
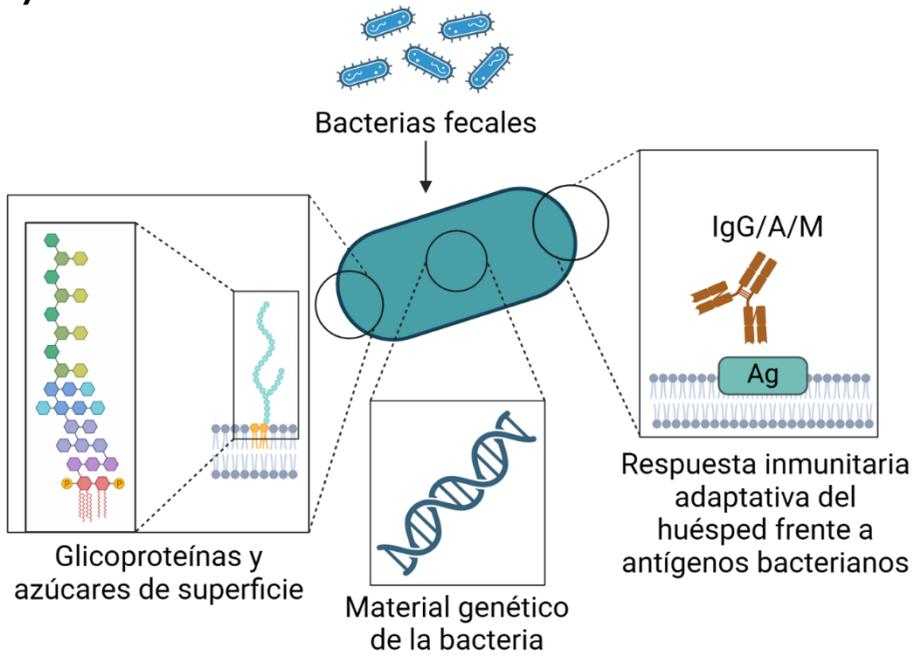


Figura 5. Técnicas para el análisis de microbiota. A) Técnicas de secuenciación del genoma completo (WGS) o de un gen concreto (16S ARNr) de las bacterias. B) Análisis multiparamétrico de las bacterias para el análisis de la cobertura de inmunoglobulinas, patrón de azúcares y contenido genético. Figura realizada con Biorender.

B)

Análisis por citometría de flujo



4.3.2. Citometría de flujo

El análisis de la microbiota mediante citometría de flujo surge en 2011 como una alternativa rápida, económica y establecida en los laboratorios convencionales para facilitar el flujo de trabajo de análisis de las bacterias, que hasta la fecha estaba limitado a la secuenciación. Su implementación permite ver de forma global el microambiente microbiano, lo cual proporciona una información diferente a las frecuencias de especies aisladas, pero igualmente valiosa. Mediante esta técnica se genera un estudio multivariable, con la caracterización del tamaño y las subestructuras celulares, junto con la posibilidad de incluir anticuerpos específicos para detectar ácidos nucleicos, azúcares o inmunoglobulinas²¹⁵ (**Fig. 5B**).

Aunque no permite la identificación taxonómica específica de bacterias como es el caso de las técnicas de secuenciación, el análisis de microbiota basado en citometría de flujo ofrece una resolución adecuada para estudiar cambios en la comunidad microbiana. A este respecto se ha visto que alrededor del 75% de las bacterias de una misma población generada por el algoritmo del análisis de los datos generados por citometría de flujo pertenecen típicamente al mismo taxón²¹⁵⁻²¹⁷. El análisis de la totalidad de bacterias fecales por citometría de flujo combinado con la separación celular basada en marcadores de superficie (*sorting*) ha ilustrado que solo un porcentaje bajo de OTUs se pueden asociar de forma consistente con cambios fenotípicos, indicando que las modificaciones que ocurren en la totalidad de la microbiota fecal afectan a un número relativamente pequeño de taxones²¹⁸.

4.4. Técnicas de normalización de microbiota

En situaciones de autoinmunidad, a nivel intestinal hay numerosos mecanismos que están desregulados. En estas situaciones, la modulación de la composición de la microbiota surge como una vía para restaurar el equilibrio al corregir la disbiosis.

La normalización de microbiota para la adquisición de un perfil eubiótico en humanos se realiza principalmente mediante la suplementación con probióticos y/o prebióticos²¹⁹⁻²²¹ y, en casos donde ningún otro tratamiento presenta eficacia, trasplantes fecales²²². La evidencia en este campo es aún escasa y se encuentra lejos de ser concluyente, ya que los resultados son ambiguos^{223,224}.

En modelos murinos de experimentación, se dispone en la actualidad de tres vías de modificación de la microbiota intestinal: la administración directa de una o varias cepas bacterianas de forma oral, la convivencia de ratones con diferente microbiota (*cohousing*) o el uso de *littermates* (**Fig. 6**).

- Administración oral de bacterias.

La administración de bacterias por vía oral-intragástrica permite la incorporación por vía externa de una o varias especies a la microbiota gastrointestinal. Este proceso puede realizarse a ratones que hayan sido previamente tratados con antibióticos o no, lo cual altera la capacidad de colonización de las bacterias administradas. Por una parte, cuando se usan ratones previamente tratados con antibióticos, la colonización es más rápida²²⁵, pero es menos fidedigna con la realidad al ignorar la alta diversidad encontrada en el intestino en condiciones fisiológicas. Si los ratones conservan su microbiota en el momento de la administración exógena, el establecimiento de las bacterias en el ecosistema es un proceso más lento, pero permite evaluar efectos de simbiosis y mutualismo con las especies residentes del intestino^{226,227}.

- Cohousing.

Esta metodología de normalización de microbiota es conocida como transferencia horizontal, y se fundamenta en la naturaleza coprofágica de los ratones cuando comparten cubeta (fenómeno de *cohousing*)²²⁸. Aquí, animales con diferentes composiciones de microbiota transferida de forma vertical por la madre

son transferidos a la misma cubeta tras el destete, tras lo cual la composición de ambas microbiotas va cambiando paulatinamente. El *cohousing* tiene un fundamento similar a la administración oral, pero se extiende durante toda la vida del ratón.

La principal limitación de este modelo es la presencia de una microbiota basal en los ratones de forma previa a la compartición de cubeta. Se ha visto que durante las primeras semanas de vida se genera un nicho para los microorganismos adquiridos ambientalmente por el cual la microbiota se establece y se vuelve resistente a la colonización por especies nuevas²²⁹. Por este motivo, se ha reportado una eficiencia media en la normalización de la microbiota con la técnica de *cohousing*²³⁰.

- Generación de *Littermates*.

Esta técnica, también conocida como transmisión vertical, es la técnica más eficiente en normalización de microbiota cuando se trabaja con dos fondos genéticos, donde cada uno posee una composición microbiana intestinal diferente. Este modelo consiste en el uso de ratones de F2 resultado de cruzar ratones heterocigotos de un gen concreto²³⁰. La composición de la microbiota, tanto en humanos como en ratones, se determina en los momentos tempranos de la vida, principalmente por el repertorio presente en el canal del parto, la piel y la leche materna²³¹. La generación de *littermates* F2 permite la cohabitancia de ratones con diferentes fondos genéticos generados del mismo cruce original, expuestos a los mismos determinantes de microbiota y mantenidos en la misma cubeta durante el desarrollo de la vida, lo cual refuerza el mantenimiento de una única microbiota en la cubeta²³⁰.

5. INMUNOLOGÍA DEL GALT

El sistema inmunitario asociado al intestino (GALT, del inglés *Gut-associated lymphoid tissue*) ha evolucionado para no tener un continuo estado de activación ante los millones de bacterias que pueblan el tracto gastrointestinal^{232,233}. En su lugar, los antígenos comensales son reconocidos por células reguladoras que inducen un estado de tolerancia inmunológica hacia las bacterias comensales beneficiosas. En presencia de perturbaciones homeostáticas, sin embargo, las células del GALT responden ante las bacterias del intestino generando una situación de inflamación intestinal que se da, primero de forma local y, en última instancia, de forma sistémica.

5.1. Estructura y funcionamiento inmunitario

El GALT se compone de las Placas de Peyer (PP), folículos linfoides aislados (ILFs, del inglés *Isolated lymphoid follicles*) distribuidos por la lámina propia del intestino delgado (SILP, del inglés *Small intestine lamina propria*) y los ganglios linfáticos mesentéricos (mLN, del inglés *Mesenteric lymph nodes*)²³⁴ (**Fig. 7**).

Las PP son los órganos linfoides con el mayor grado de organización dentro de la estructura del GALT, siendo los sitios de iniciación de la respuesta inmunitaria intestinal gracias a su localización subepitelial en el intestino delgado. En ellos se generan un gran número de CGs donde las células B proliferan y se diferencian, principalmente, hacia la síntesis de IgA^{235,236}. A nivel sistémico, los CGs constituyen estructuras transitorias que se forman tras la inmunización o infección y que desaparecen tras la resolución de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, los CGs presentes en las PP persisten de forma crónica debido a la continua exposición a bacterias y antígenos alimenticios que generan el repertorio de células B intestinales²³⁷.

En paralelo, los ILF se encuentran por toda la lámina propia intestinal y aparecen con un número y tamaño muy inferior a las PP²³⁸. Estas localizaciones inmunitarias desarrollan función ‘de reserva’, donde se localizan muchas células inmunitarias, pero no una respuesta de centro germinal. Solo un sobrecrecimiento bacteriano con una consecuente translocación descontrolada es capaz de inducir el desarrollo de reacciones de CGs.

Tanto las PP como los ILF se encuentran separadas del lumen por el epitelio intestinal, compuesto por una capa de enterocitos y células M (del inglés, *microfold*) intercalados. Éstas últimas poseen una superficie luminal sin microvellosidades y se encuentran en íntimo contacto con los microorganismos intestinales¹⁷⁵, lo que las hace la ruta de elección para el paso controlado de microorganismos o fragmentos bacterianos por endocitosis hasta las PP²³⁹.

Tras el reclutamiento y activación de CPAs a las PP, se induce una gran secreción de ácido retinoico, principalmente por parte de las CDs CD103⁺. Este mediador induce en las células T y B la expresión de la integrina $\alpha_4\beta_7$, implicada en la recirculación de los linfocitos al intestino mediante su interacción con el receptor MadCAM-1 (expresado en los vasos que irrigan el GALT)²⁴⁰. Además, las CDs también están implicadas en el transporte de bacterias hasta los mLN, desde donde, una vez activadas, pueden entrar en circulación sistémica y ejercer funciones protectoras en sitios periféricos^{241,242}.

5.2. Componente humoral: IgA y homeostasis

Tras la activación y diferenciación de las células plasmáticas por comensales bacterianos, se induce un cambio de isotipo hacia IgA. Este proceso ocurre principalmente en las PP de forma T-dependiente²⁴³, pero también puede darse en los ganglios linfáticos mesentéricos e inguinales y en los ILF de la lámina propia intestinal, de forma T-independiente^{244,245}.

El cambio de isotipo hacia IgA está regulado a nivel transcriptómico por TGF- β , ácido retinoico y la estimulación de CD40²⁴⁶. La síntesis de IgA está influenciada parcialmente por el fondo genético del individuo, pero también por la composición de la microbiota, ya que se ha visto que, a través de la activación de los TLR, ciertas bacterias intestinales son capaces de inducir la síntesis de TGF- β en CDs, células Tfh y células subepiteliales y de estimular la formación de CGs²⁴⁷⁻²⁴⁹. En este proceso, las especies del género *Anaeroplasm* y las bacterias filamentosas segmentadas (SFB, del inglés *Segmented filamentous bacteria*) han sido probadas como fuertes inductoras de IgA²³⁵.

La importancia del cambio de isotipo hacia IgA radica en la variedad de roles que esta inmunoglobulina puede desempeñar. Por un lado, la IgA secretada hacia el lumen intestinal tiene la capacidad de neutralizar la acción de ciertas bacterias patógenas al facilitar su eliminación. La interacción de IgA con bacterias comensales favorece, además, su internalización a las PP debido a la capacidad de estos anticuerpos de inducir la endocitosis por parte de las células M,^{250,251}. Por otro lado, la estructura espacial de la IgA le impide activar el complemento, lo que a su vez previene una respuesta proinflamatoria que, de iniciarse en el intestino, se prolongaría en el tiempo por la constante estimulación de la microbiota comensal²⁵².

La constante interacción de la IgA con la microbiota puede tener varios efectos. Por un lado, aunque la mayoría de los anticuerpos antinucleares son de isotipo IgG, se ha visto que también hay IgA producida en el intestino con reactividad nuclear, por lo que estos anticuerpos generados en el intestino pueden ser patogénicos²⁵³. En paralelo, las células activadas en el intestino también pueden ejercer un papel protector, donde el contacto con bacterias intestinal moldea un repertorio de células B que, al recircular sistémicamente y alcanzar localizaciones periféricas, previenen la proliferación de bacterias y protegen de la sepsis al activarse y secretar IgA²⁵⁴.

5.3. Barrera intestinal

Bajo circunstancias normales, la lámina propia y las PP están separadas del lumen intestinal por una barrera con un componente físico y un componente bioquímico. Por un lado, la barrera física se constituye del epitelio intestinal, cuya función es limitar y regular el paso de bacterias y pequeñas moléculas, como metabolitos, iones y agua, entre el lumen y la lámina propia^{255,256}. La selectividad y permeabilidad de esta estructura está determinada en gran medida por las uniones estrechas intercelulares (TJ, del inglés *Tight junctions*) establecidas entre los enterocitos adyacentes²⁵⁷, que se componen de varias moléculas de ocludina y, al menos, una molécula de claudina que se une a la parte interna de la célula a través del citoesqueleto^{257,258}. Por otro, de forma adyacente a la capa de enterocitos se localizan los componentes bioquímicos que limitan la traslocación de bacterias, siendo los más importantes la IgA secretora, los péptidos antimicrobianos y la lisozima presente en la capa de moco intestinal¹⁷¹.

En condiciones de homeostasis, la función barrera se mantiene gracias a señales microbianas y las señales inmunológicas del sistema innato y adaptativo²⁵⁹. En situaciones donde el sistema inmunológico se altera y aparece inflamación crónica, la barrera intestinal pierde su integridad^{258,260}. Diferentes investigaciones han mostrado que este proceso está mediado por el entorno inflamatorio local que se genera y las modificaciones tanto de la comunidad comensal como de las funciones metabólicas que estas modulan²⁶¹⁻²⁶⁴. Cuando la ecología intestinal está dominada por bacterias proinflamatorias, estas pueden inducir una disminución de las moléculas implicadas en el mantenimiento de la función barrera (occludina, claudinas, y moléculas de adhesión de uniones) lo cual se puede traducir en la pérdida de la integridad de la barrera intestinal. Cuando esta se ve alterada, las bacterias pueden translocar e inducir una respuesta inflamatoria tanto de forma local en el GALT como en órganos linfoides distales, incluyendo el páncreas, el hígado o el bazo^{265,266}.

En el contexto del LES, la alteración de la permeabilidad intestinal es un factor agravante de la enfermedad, y se ha comprobado en pacientes de LES y en modelos murinos que la translocación bacteriana de *Enterococcus gallinarum* y *Lactobacillus reuteri*^{177,178} presentan una asociación directa con la severidad de la enfermedad.

De forma global, los efectos de la disrupción de la permeabilidad intestinal en la patogénesis del LES se ilustran en la **figura 8**.

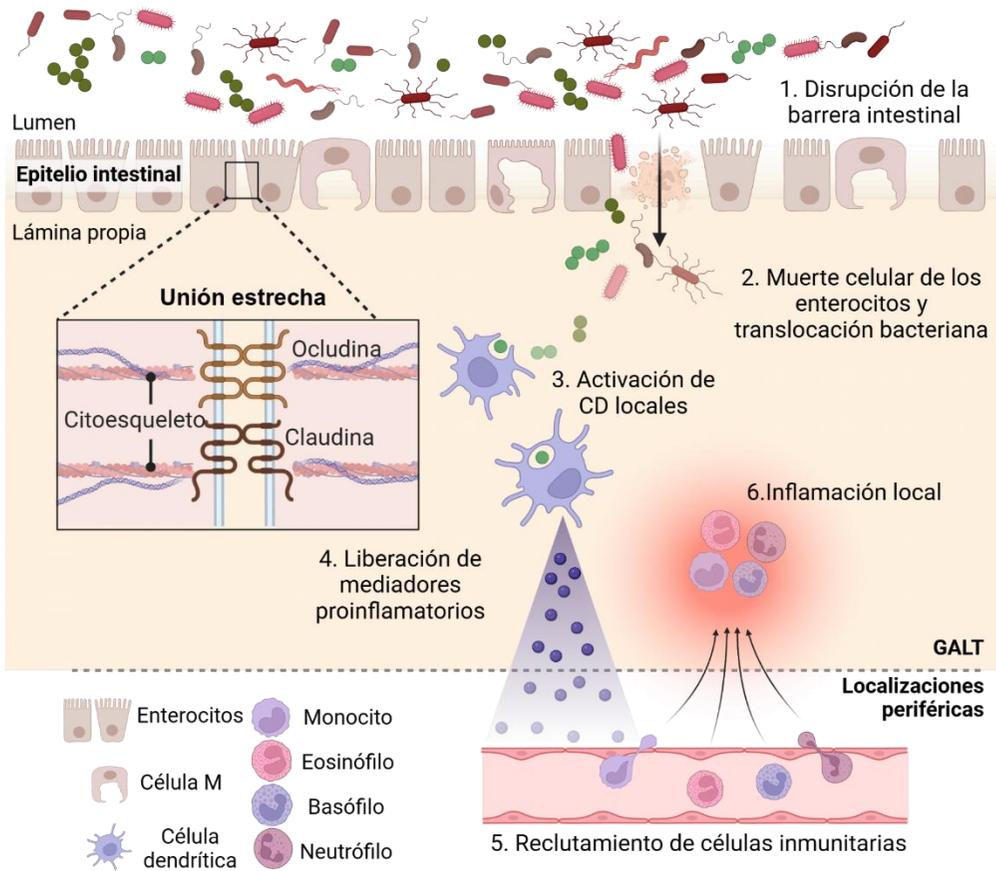


Figura 8. Alteraciones inducidas por la disrupción de la permeabilidad intestinal en el LES. Figura realizada con Biorender.

6. CÉLULAS B REGULADORAS Y MICROBIOTA

Las células B han sido clásicamente consideradas importantes mediadores de la respuesta inmunitaria por ser su función principal en este proceso la producción de anticuerpos, seguida de la presentación de antígenos. Sin embargo, en los últimos 40 años, se ha visto que un subgrupo de estas células presenta un papel determinante en la regulación de la inflamación y la prevención de los cuadros clínicos de autoinmunidad. Estas células, conocidas como B reguladoras (Bregs), suprimen la actividad de células T, CD8, monocitos y otras subpoblaciones de células B con funciones inflamatorias. Por su amplio rango de funciones, las Bregs tienen un papel importante como mediadoras de la respuesta inmunitaria en homeostasis y en situaciones de autoinmunidad^{267,268}.

Los mecanismos por los cuales llevan a cabo estas acciones incluyen la secreción de IL-10, IL-35, granzima B (GZMB) y TGF- β y/o el propio contacto con otras células mediante la expresión de del ligando de muerte programada 1 (PDL1, del inglés *Programmed death-ligand 1*) y el ligando de Fas²⁶⁹⁻²⁷¹.

En pacientes de LES se ha observado que esta subpoblación celular aparece significativamente deficiente, tanto en números absolutos como en capacidad funcional²⁷², especialmente en aquellos individuos con una nefritis activa²⁷³.

En estudios de ratón, la observación inicial de que la eliminación de células B en algunos modelos de lupus era un factor agravante de la enfermedad sugirió por primera vez la posible capacidad reguladora de estas células²⁷⁴. Sin embargo, estudios coetáneos mostraron que la eliminación de células B totales tras el establecimiento de la enfermedad tenía un efecto beneficioso²⁷⁵, sugiriendo un papel complejo y dinámico de la población B en la fisiopatología del LES. En ratones NZB/W CD19^{-/-} se encontró

además, que la transferencia de una subpoblación de células B con capacidad reguladora incrementa notablemente la supervivencia de los mismos, señalando a un papel regulador activo y directo del fenotipo Breg²⁷⁴.

Una de las principales limitaciones para aprovechar el potencial terapéutico de las células B reguladoras es la falta de una caracterización clara que posibilite su aislamiento, ya que hasta la fecha no se ha propuesto un fenotipo consensuado en humanos ni en ratones. Las diferentes poblaciones de células Bregs descritas fenotípicamente en ratón y en humanos se encuentran resumidas en las **Tablas 3 y 4**, respectivamente.

Tabla 3. Subpoblaciones de células B productoras de IL-10 en ratón.

Fenotipo	Función	Mecanismo	Ref
ZONA MARGINAL (ZM)	Inducción de tolerancia ante trasplante alógeno cardíaco	Inducción de células Th foliculares mediante la secreción de IL-10	276
CD138+	Control de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE)	Liberación de IL-10 o IL-35	269
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1D ^{HIGH}	Inhibición de la respuesta inmunitaria	Secreción de IL-10	277
CD1D ^{HIGH} CD23 ^{HIGH} CD21 ^{INT}	Papel protector en mucosas	Secreción de IL-10	278
CD19 ⁺ CD1D ⁺ CD21 ⁺ CD23 ⁺ IGM ⁺ CD24 ⁺ CD62L ⁺	Diferenciación de Tregs e inhibición de diferenciación de Th1	Secreción de IL-10 y/o TGF- β	278–281
CD19 ⁺ CD43 ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁺ CD40 ⁺			
CD19 ⁺ CD43 ⁺ CD5 ⁺			

Tabla 4. Subpoblaciones de células B productoras de IL-10 en humano.

Fenotipo	Función	Mecanismo	Ref
CD11 ^{HIGH}	Inducción de Tregs e inhibición de inflamación en alergias	Secreción de IL-10	282-284
CD5 ⁺			
CD19 ⁺ CD24 ^{HIGH} CD38 ^{HIGH}	Supresión de la diferenciación de Th1 tras la estimulación de CD40	Secreción de IL-10	272
CD19 ⁺ CD25 ^{HIGH} CD27 ^{HIGH} CD86 ^{HIGH} CD1D ^{HIGH} IL-10 ^{HIGH} TGF- B ^{HIGH}	Inhibición de la proliferación de células T CD4 ⁺	Secreción de IL-10	285
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1D ⁺ IGM ⁺ CD147 ⁺ IL-10 ⁺ CD25 ⁺	Regulación de la respuesta T hacia un perfil regulador y antiinflamatorio tras la estimulación con IL-21	Secreción de IL-10 y expresión de Granzima B	277

La evidencia disponible hasta el momento parece sugerir que no existe un compromiso de linaje de células Bregs impulsado por uno o varios factores de transcripción específicos, sino que el fenotipo regulador se adquiere en función de las condiciones ambientales²⁸⁶. A pesar de esto, se ha visto mediante análisis de metatranscriptómica que, tanto en humano como en ratón, las células Bregs exhiben un estado activo de proliferación y diferenciación con mecanismos fuertemente regulados para su supervivencia y función reguladora²⁸⁷.

6.1. Citoquinas con función reguladora

Dentro de los mecanismos por los cuales las Bregs ejercen su papel inmunosupresor, los descritos con más detalles son aquellos mediados por la secreción de citoquinas que modulan la respuesta inmunitaria. Entre ellas, las más destacadas son IL-10, IL-35, TGF- β y la GZMB.

6.1.1. IL-10

Las funciones reguladoras de las Bregs están principal, pero no exclusivamente, definidas por la secreción de IL-10²⁷⁷. En el contexto del LES, esta citoquina posee un papel dual. Por un lado, se sabe que es capaz de estimular la respuesta B a nivel sistémico y favorecer la diferenciación hacia células plasmáticas y el cambio de isotipo a nivel de los CGs de forma extrafolicular^{288,289}. Por otro, constituye una citoquina pleiotrópica con potentes efectos tolerogénicos²⁹⁰.

Dentro de sus capacidades inmunosupresoras se encuentran la inhibición de la expresión del MHC-II y de moléculas coestimuladoras de la respuesta inmunitaria, la supresión de la respuesta Th1 y Th17 y la inducción del fenotipo de células Tregs^{272,290-292}.

Por esta dualidad en el rango de efectos de la IL-10, la clave de su papel en el LES podría residir en la temporalidad. En modelos murinos se ha visto que la supresión de la señalización de IL-10 después del establecimiento de la enfermedad induce la producción de autoanticuerpos y empeora la patogénesis²⁹³; por el contrario, el bloqueo de esta vía desde el nacimiento de los animales retrasa el inicio de la producción de anticuerpos y la aparición de proteinuria y glomerulonefritis²⁹⁴. En base a estas observaciones se ha hipotetizado que el papel de la IL-10 en la fisiopatología del LES podría estar relacionado con las respuestas foliculares y extrafoliculares. Asumiendo que las respuestas extrafoliculares preceden a las foliculares, el bloqueo temprano de IL-10 se traduciría mayormente en una inhibición de la respuesta extrafolicular y el inicio de la respuesta patogénica de las células B, retrasando así el

desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, en etapas posteriores, cuando la respuesta folicular se ha desarrollado, el papel de la IL-10 sobre la respuesta extrafolicular ya no sería tan notable y estaría mayormente dirigido hacia inhibir la respuesta inflamatoria Th1 y Th17. En consecuencia, el bloqueo de IL-10 en este punto acarrearía un empeoramiento de las manifestaciones fenotípicas²⁹⁵.

Las células B productoras de IL-10 (denominadas B10) en ratones derivan de los precursores peritoneales, las células B1a, y, en menor medida, de los precursores B2 del bazo^{296,297}. En humanos, por su parte, las células B10 presentes en sangre periférica derivan principalmente de células B CD24^{hi} CD38^{hi} y CD24^{hi} CD27⁺^{277,285}.

6.1.2. IL-35

La IL-35 es un heterodímero perteneciente a la familia de la IL-12 implicada en la regulación de los fenómenos de autoinmunidad^{269,298}. El principal mecanismo de actuación de esta citoquina es la inducción de proliferación en células Tregs y la inhibición de la respuesta Th17. Además, las células B que secretan IL-35 inducen la diferenciación de otras células B hacia un perfil secretor de IL-35, creando un bucle de retroalimentación positiva²⁹⁹.

Estudios recientes han indicado que las células plasmáticas que secretan IL-35 son clones diferentes de las que secretan IL-10, sugiriendo diferentes mecanismos de regulación para la secreción de una u otra citoquina²⁶⁹.

6.1.3. TGF-beta

El TGF- β producido por las Bregs está implicado en una amplia gama de procesos biológicos como consecuencia de la ubicua expresión de su receptor en la mayoría de células somáticas. Entre ellos destaca la regulación inmunitaria mediante la inhibición de la proliferación celular^{300,301}.

En el caso de las Bregs, el TGF- β está mayormente dirigido a células T proinflamatorias, teniendo además la capacidad de inducir la diferenciación de células T CD4⁺ vírgenes a Tregs³⁰².

6.1.4. Granzima B

Las células B productoras de GZMB han sido encontradas en un alto número de contextos inmunológicos, como son la leucemia linfocítica crónica de células B, infiltrados de tumores sólidos, enfermedades autoinmunes, infecciones, y en pacientes tolerantes de trasplantes de riñón. Su presencia se correlaciona con una menor síntesis de citoquinas proinflamatorias mediante la inhibición de la activación de células dendríticas, células T y otras poblaciones de células B³⁰³⁻³⁰⁵.

6.2. Inducción de células B reguladoras

La literatura disponible parece indicar que cualquier célula B tiene la potencialidad de diferenciarse a una célula B reguladora en respuesta a la estimulación adecuada¹⁸². Dentro de los factores ambientales, la microbiota se ha propuesto como un estímulo muy importante en la inducción de Bregs, pues la eliminación de la microbiota intestinal con antibióticos induce en ratones MRL/lpr una dramática reducción en la frecuencia de esta subpoblación y una intensificación de la enfermedad³⁰⁶. La suplementación de forma oral con ADN bacteriano en estos y otros ratones induce un incremento en la abundancia de células Bregs en el bazo y los mLN y una concomitante atenuación de las manifestaciones del LES¹⁸².

La inducción de un fenotipo regulador por parte de la microbiota en las células B sigue una dinámica temporal altamente regulada a nivel intestinal. Se ha visto en ratones GF que la colonización con un consorcio de bacterias no patogénicas induce en un primer momento la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias como son el TNF- α o el IFN- γ . Tras esto, se incrementa de forma progresiva la síntesis de IL-10, lo cual limita la expresión de las citoquinas proinflamatorias, evitando que la respuesta

inmunitaria se exacerbe. A pesar de que en este contexto se induce la expresión de otras moléculas reguladoras, se sabe la inflamación se regula mayormente por la IL-10 cuya síntesis puede estar mediada por la activación bacteriana de los TLRs^{307,308}. No obstante, las bacterias intestinales también pueden inducir la diferenciación hacia un fenotipo B10 de forma TLR-independiente, mediante la inducción de la secreción de IL-6 y IL-1 β por CD4 y macrófagos³⁰⁶.

En paralelo, las bacterias pueden modular la diferenciación hacia células Bregs mediante sus metabolitos, pues se ha visto que los SCFAs, y en especial el acetato³⁰⁹, pueden inducir un aumento de la producción de IL-10 por las células B³⁰⁹.

Finalmente, los plasmablastos y las células plasmáticas productoras de IL-10 generadas en el intestino por acción de la microbiota ejercen funciones regulatorias durante procesos inflamatorios autoinmunes³¹⁰. De especial interés, las células plasmáticas IgA⁺ que parecen originarse en la lámina propia del intestino viajan a sitios inflamados lejos del intestino y atenúan la inflamación³¹¹.

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

El LES constituye una enfermedad altamente heterogénea en la que factores genéticos y ambientales interactúan provocando un cuadro de disregulaciones inmunológicas, inflamación persistente y daño multiorgánico. La inclusión en 2019 de la presencia de ANAs como criterio diagnóstico de LES supuso un primer paso en la eliminación de la alta diversidad observada entre pacientes. Sin embargo, este rasgo no es exclusivo del LES, por lo que la ausencia de criterios diagnósticos específicos sigue suponiendo una fuente de variabilidad dentro de las manifestaciones observadas entre los pacientes de LES. Como consecuencia, se carecen de tratamientos efectivos en la cura y el manejo de esta enfermedad a largo plazo, lo cual supone una brecha considerable en el sistema de cuidado y atención de los pacientes de LES.

Los estudios dirigidos a superar esos desafíos han identificado numerosos alelos de riesgo en genes de susceptibilidad y diferentes factores ambientales de susceptibilidad al LES. Entre ellos, el gen *Bank1* se ha asociado con el desarrollo de LES en estudios de pacientes y en modelos murinos de la enfermedad, tanto espontáneos como inducidos. De forma adicional, en los últimos años la microbiota intestinal ha sido reconocida como uno de los factores con notable disregulación en un amplio espectro de enfermedades autoinmunes, incluido el LES. A pesar de dichos avances, la manera en la que ambos factores interactúan continúa siendo objeto de investigación.

Dentro de los mecanismos propuestos como mediadores entre la composición de la microbiota y la actividad inmunitaria en contextos de autoinmunidad se encuentran las células B reguladoras. La activación de estas células crea un ambiente inmunoregulatorio capaz de controlar la inflamación y la extensión en el tiempo de la

respuesta inmunitaria. En pacientes de enfermedades autoinmunes, esta subpoblación presenta una notable disminución en número y funcionalidad, y se ha visto que su activación puede ser regulada por la microbiota intestinal

Dado lo anterior, la **hipótesis** central de este trabajo es que la composición de la microbiota intestinal podría ser uno de los mecanismos efectores por los cuales el fondo genético podría estar modulando el cuadro de LES. Según dicha hipótesis, se propone además en este trabajo que perfiles concretos de microbiota intestinal podrían actuar como inductores fuertes o débiles de células B reguladoras, mejorando o empeorando de esta forma la activación de la respuesta inmunitaria persistente característica del LES. Siguiendo esta premisa, la modificación de la composición de la microbiota de forma exógena podría ser una vía de regulación del fenotipo de LES, abriendo así la posibilidad a nuevas terapias para el manejo de esta enfermedad de forma concomitante a los tratamientos biológicos.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** del presente trabajo es dilucidar la contribución de la composición de la microbiota y el fondo genético en el desarrollo del LES. Para ello, se hará uso de dos modelos murinos de ratón mediados por la señalización de TLR7, con la implementación de técnicas de análisis y modificación de la microbiota.

Definido el objetivo principal, se definen los siguientes **objetivos específicos**:

- 1. Caracterizar las manifestaciones a nivel intestinal en ratones con lupus usando un modelo experimental mediado por la activación de TLR7.**
 - 1.1. Análisis de las alteraciones en la permeabilidad intestinal.
 - 1.2. Estudio de los cambios en la respuesta B en el tejido linfoide intestinal a nivel celular y humoral.
- 2. Estudiar los cambios en la microbiota intestinal asociados al desarrollo de la enfermedad mediada por TLR7.**
- 3. Estudiar la contribución de *Bank1* en el desarrollo de lupus en un modelo murino mediado por la actividad de TLR7.**
 - 3.1. Medida de las variaciones en la respuesta inmunitaria celular y humoral de las células B en condiciones basales a nivel intestinal.
 - 3.2. Análisis del fenotipo desarrollado tras la inducción de lupus en ausencia de *Bank1* a nivel sistémico e intestinal.
 - 3.3. Caracterización de la microbiota intestinal tras la eliminación de *Bank1* en ratones en homeostasis y ratones con lupus.
- 4. Analizar el efecto de *Bank1* en la inducción de células B productoras de IL-10 en condiciones basales y tras el desarrollo de un fenotipo de lupus.**
- 5. Estudiar el efecto de la microbiota en la modificación de la respuesta inmunitaria intestinal y en la inducción de células B secretoras de IL-10 en diferentes fondos genéticos.**
 - 5.1. Evaluación de las manifestaciones sistémicas e intestinales en ratones *littermates* y *single cage*.

- 5.2. Análisis de la respuesta inmunitaria hacia la microbiota en ratones *littermates* y *single cage*.
- 5.3. Evaluación de la inducción de células B productoras de IL-10 en ratones de diferente genotipo con microbiota normalizada.
6. **Identificar con mayor detalle aquellas especies bacterianas capaces de inducir en células B no diferenciadas la síntesis de IL-10.**
 - 6.1. Análisis de la capacidad de *P.distasonis* en la modificación de la respuesta inmunitaria en ratones con lupus.
 - 6.2. Estudio de los efectos de la suplementación con *P.distasonis* en la diferenciación de células B hacia un fenotipo secretor de IL-10.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos de experimentación.

1.1. Declaración de aprobación de experimentación animal.

Los experimentos que involucraron el uso de animales de experimentación se llevaron a cabo siguiendo las directrices y políticas dictadas por la Ley 53/2013. Todos los protocolos fueron previamente aprobados por el comité ético de la Junta de Andalucía y el Ministerio español de Agricultura para el uso y cuidado de animales (Proyecto 06/03/2020/035, concedido a María Morell-Hita).

1.2. Cepas de ratones y mantenimiento.

1.2.1. Generación y obtención de animales.

Los ratones C57BL/6J no modificados genéticamente (**WT**, del inglés *wild type*) fueron comprados de los laboratorios comerciales Charles River, y los ratones *Bank1*^{-/-} (referidos en este trabajo como **BIKO**) fueron un regalo del Dr. T. Kurosaki (Instituto RIKEN, Kioto, Japón).

Los ratones modificados genéticamente para la sobreexpresión de *Tlr7* (referidos en este trabajo como **TLR7Tg**) se obtuvieron de la Dra. Darise Farris, de la Fundación de Investigación médica de Oklahoma (*Oklahoma Medical Research Foundation*), en Estados Unidos. Estos ratones fueron creados y mantenidos sobre un fondo genético C56BL/6J, y corresponden concretamente a la cepa de ratones transgénicos TLR7.Tg.⁶³¹². La generación de estos animales se llevó a cabo mediante el uso de un constructo RP23-139P21 BAC compuesto de los genes *Tlr7*, *Tlr8* y *Tmsb4x*, donde los primeros 83Kb fueron reemplazados por un casete de neomicina para permitir la expresión exclusiva del gen *Tlr7*. La versión final del constructo fue inyectada en

cigotos derivados de ratones C57BL/6J, generándose 6 subcepas con diferentes números de copias del gen *Tlr7*. La cepa TLR7.Tg.6 resultó una fenocopia de los ratones con el locus *Yaa*, con un número de copias de *Tlr7* que oscilaba entre 9 y 16 en el cromosoma Y. Esta modificación genética resulta en un incremento de entre 4 y 9 veces de los niveles de ARNm de *Tlr7* en los machos de este modelo.

Los ratones B1KO se cruzaron con los ratones TLR7Tg para obtener ratones **TLR7Tg/B1KO**.

1.2.2. Mantenimiento de ratones en animalario.

Los animales fueron alojados y criados en condiciones libres de patógenos específicos (SPF del inglés *specific pathogen free*) en las instalaciones del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

Todos los ratones fueron mantenidos en jaulas con aire filtrado renovadas una vez por semana por personal capacitado. En ellas, los animales tenían acceso a comida estándar comercial y agua estéril *ad libitum*, y se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura (20-26°C) y humedad (45-55% de humedad relativa). Sus ritmos circadianos se regularon mediante condiciones de luz diurna con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

1.3. Modelos de lupus.

1.3.1. Modelo espontáneo.

En los ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO, el lupus se desarrolló de forma espontánea con el tiempo hasta alcanzar el punto de sacrificio a las **30-32 semanas de vida**. Estos ratones no experimentaron ningún tipo de tratamiento a lo largo de su vida. A modo de controles de este modelo se utilizaron ratones WT macho sin enfermedad sometidos únicamente a los procesos naturales de envejecimiento³¹².

1.3.2. Modelo agudo.

El modelo inducido por el agonista de TLR7 **IMQ** se desencadenó en ratones macho WT y B1KO a las **12 semanas de edad**. A partir de este punto, el IMQ se aplicó tópicamente en su formulación de Aldara® o Zyclara®, ajustando la dosis para que cada ratón recibiera 1.25 mg de IMQ/dosis. El tratamiento consistió en tres administraciones por semana en días alternos de forma tópica en la oreja izquierda durante 8 semanas, y los ratones fueron sacrificados a las **20 semanas de edad**.

Para este modelo se usaron homólogos WT y B1KO que se dejaron envejecer hasta las 20 semanas sin recibir IMQ a modo de control (ratones no tratados).

1.3.3. Generación de *littermates*.

Con el objetivo de analizar el papel de la microbiota en la regulación del desarrollo de lupus, se desarrolló el modelo agudo de aplicación de IMQ en ratones *littermates* portadores de la microbiota asociada a los ratones B1KO. Para ello, se cruzó una hembra B1KO con un macho WT (línea parental, P) y se cruzaron entre sí las crías de la F1, las cuales eran heterocigotos para *Bank1* (*Bank1^{+/-}*). El resultado de los cruces de F1 X F1 generó las crías F2, las cuales fueron genotipadas a las tres semanas de edad y destetadas a las cuatro semanas de edad. Siguiendo la segregación mendeliana, entre las crías de la F2 se obtuvieron ratones *Bank1^{+/+}* (WT), *Bank1^{+/-}* (heterocigotos, HET) y *Bank1^{-/-}* (B1KO), todos ellos portadores de una microbiota asociada a B1KO. Las crías de F2 fueron distribuidas uniformemente en las cajas de destete asegurando la representación de, al menos, un ratón de cada genotipo por caja. Para este modelo se usaron como animales control homólogos WT y B1KO tratados y no tratados criados en jaulas separadas y provenientes de padres homocigotos (ratones *single cage*) para mantener la microbiota intestinal asociada a cada genotipo por separado.

1.3.4. Administración oral de bacterias.

Para el modelo de **suplementación con *P. distasonis*** se diseñó una cinética de administración por vía oral de 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) de *P.*

distasonis de forma diaria desde las 9 semanas de edad a ratones WT y B1KO. Esta suplementación se mantuvo durante el periodo de IMQ en el grupo designado para recibir tratamiento, y durante la misma ventana temporal en los ratones no tratados. Además, se estableció como control un grupo de ratones homólogos tratados con IMQ que recibieron de forma oral la solución usada para la dilución de las bacterias((PBS 1x).

1.4. Extracción de muestras *in vivo*.

Para los análisis de seguimiento temporal de la composición de la microbiota y la respuesta en suero, se realizó una toma de muestras fecales y de sangre a diferentes puntos de edad en los ratones *in vivo* en cabina de flujo.

En estos procedimientos, los ratones fueron anestesiados con ketamina a 100mg/kg de peso y xilazina a 5mg/kg de peso diluidas en PBS 1x para posteriormente recolectar sangre de la vena safena mediante el uso de capilares Microvette[®] (Sarstedt). Dichas muestras de sangre se dejaron coagular durante toda la noche a 4°C y fueron centrifugadas al día siguiente a 9560g durante 10 minutos a 4°C para la obtención de suero. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La recolección de muestras de heces se realizó mediante el uso de tubos Eppendorf[®] de 2ml de capacidad. Para ello, se inmovilizó al ratón y se estimuló la excreción mediante masaje abdominal, momento tras el cual la muestra fecal fue directamente recogida en el tubo. Las muestras de heces se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

1.5. Medida de la permeabilidad intestinal *in vivo*.

El estado de la barrera intestinal fue evaluado mediante la medida de la permeabilidad *in vivo*. Con este fin, se usó un **dextrano de 4KDa** (Sigma) acoplado a la molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC), siguiendo el protocolo definido

por Zegarra-Ruiz D.F. et al¹⁷⁸. Los ratones se mantuvieron en ayunas de comida y agua durante 4 horas, periodo tras el cual se pesaron y se les administró por vía oral el dextrano a una dosis de 250mg/kg de peso, disuelto en PBS 1x (Gibco). En este momento, se restauró el acceso al agua y, 3 horas después, se realizó una extracción de sangre de la vena safena.

Tras la coagulación de la sangre y la obtención del suero, las muestras se diluyeron 1:4 en PBS 1x y se midió el nivel de fluorescencia usando un lector de placas *Infinite 200Pro* con longitud de onda de 485 nm para la excitación y 528 nm para la emisión. Los valores obtenidos se interpolaron en la ecuación de regresión lineal resultante de la medida de fluorescencia en muestras de concentración conocida (recta patrón).

1.6. Sacrificio animal

La realización del sacrificio de los animales se hizo siempre en cabina de flujo previamente desinfectada y tras anestésiar a los ratones como ya se ha descrito. Tras asegurar el estado de inconsciencia y anestesia de los animales mediante punción en los nervios plantares de las patas traseras, el primer paso a realizar fue la extracción de sangre mediante exanguinación por punción cardíaca usando jeringas de 1 ml (Terumo) acopladas a agujas de 25G (BD Microlance). Tras este paso, se realizó un corte longitudinal en el abdomen para levantar, primero la capa de piel y, posteriormente, el tejido peritoneal. Expuesto el interior del animal, se accedió al corazón y se realizó una perfusión corporal con 20-25 ml de PBS 1x estéril usando para ello jeringas de 20 ml (Terumo) acopladas a jeringas de 21G (BD Microlance). Tras asegurar que el volumen de sangre corporal hubo sido eliminado, se procedió a la extracción de intestino completo (incluyendo tejido linfóide y adiposo mesentérico), bazo y riñón y su conservación en DMEM (Gibco) a 4°C hasta el procesamiento.

2. Procesamiento de órganos y tejidos.

2.1. Bazo.

El bazo fue procesado mediante disgregación física usando mallas de 100 μm . Las células resultantes se recogieron en medio DMEM y se lavaron dos veces con PBS 1x/EDTA 2 mM/ seroalbúmina bovina (BSA, del inglés *bovine seroalbumin*, Sigma-Aldrich) 0.5% mediante su centrifugado a 300g durante 10 minutos a 4°C. Tras este proceso, se plaquearon 100 μl por cada pocillo de una placa de 96 para su tinción por citometría de flujo.

2.2. Intestino

Para el procesamiento del tejido intestinal se separó primero la grasa mesentérica del resto del tubo intestinal y se escindieron los **ganglios linfáticos**, todo ello en una placa de Petri con HBSS 1x (Gibco) frío.

Para la obtención de células de la **lámina propia del intestino delgado** y de las **placas de Peyer**, inicialmente se separó la porción distal, correspondiente al intestino grueso y el ciego, que se desecharon. El intestino delgado se vació con ayuda de unas pinzas de punta plana primero y enjuagues de HBSS 1x después, y se fueron separando las placas de Peyer encontradas en la periferia del tubo intestinal durante este proceso. El tejido resultante de intestino delgado, correspondiente a la lámina propia, se abrió longitudinalmente y se troceó en porciones de alrededor de 0.5 cm. Las células epiteliales se eliminaron mediante tres incubaciones sucesivas del tejido en 20 ml de HBSS 1x con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5mM, cada una de ellas de una duración de 10 minutos a 37°C. Tras esto, el tejido de la lámina propia intestinal, así como las placas de Peyer obtenidas en los pasos iniciales, se sometieron a una digestión enzimática con colagenasa D (0.25 mg/ml) y ADNasa (0.05 mg/ml) (Roche) a 37°C.

Transcurrido este tiempo, la reacción se frenó mediante la duplicación del volumen de digestión con PBS 1x/EDTA 2 mM/ BSA 0.5% y se obtuvo la solución celular mediante el filtrado de la lámina propia intestinal por mallas de 100 y 40 μm , y de las placas de Peyer por mallas de 40 μm . Los ganglios linfáticos mesentéricos no se sometieron a digestión enzimática, ya que la disgregación física usando mallas de 40 μm fue suficiente para liberar las células de la matriz y conseguir una solución celular homogénea.

2.2.1. Inmunofluorescencia.

Para el análisis mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal del intestino delgado, se destinó una porción distal de aproximadamente 2 cm del íleon. Este fragmento del tubo intestinal fue vaciado, limpiado y abierto longitudinalmente tal y como se ha descrito en la sección anterior. El tejido fue fijado brevemente en paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 30 segundos, lavado con PBS 1x y embebido en un bloque de OCT (Tissue-Tek). Para evitar la formación de burbujas de aire en la congelación del OCT que podrían degradar porciones de la muestra, los bloques se congelaron de forma rápida mediante su inmersión en metilbutano mantenido en hielo seco.

De los bloques resultantes de la inclusión del tejido se cortaron secciones de 8 μm con un microtomo que fueron teñidas con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos. Para ello, las secciones se hidrataron de forma doble durante 20 minutos cada vez: en TBS 1x inicialmente y en TBS 1x/Tween 20 (Sigma-Aldrich) 0.05% (TBS-T) a continuación. Las secciones se bloquearon con una solución compuesta de TBS-T con BSA 5%, anti-CD16/CD32 a 2mg/ml y suero de la especie productora de los anticuerpos de tinción al 10% (rata y ratón, en este caso). El bloqueo se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda, periodo tras el que las láminas se lavaron brevemente en TBS-T y se incubaron con anti-EpCam APC

diluido 1:500 (Invitrogen) y anti-Claudina 1 Alexa Fluor 488 diluido 1:50 (Invitrogen) o anti-occludina Alexa Fluor 594 diluida 1:100 (Invitrogen) durante la noche a 4°C en oscuridad.

Al día siguiente, se llevó a cabo la tinción de los núcleos mediante la tinción de las láminas con Hoechst 33342 (1 μ M, Sigma-Aldrich) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La preparación de las láminas para su visualización se llevó a cabo añadiendo 10-15 μ l del medio de montaje *SlowFade Diamond* (ThermoFisher Scientific) y colocando un cubreobjetos en la superficie de la laminilla. Tras eliminar las burbujas de aire creadas en el medio de montaje de forma cuidadosa, se capturaron las imágenes de los tejidos utilizando un microscopio de barrido láser Zeiss 710, un objetivo de inmersión en aceite Zeiss Plan-Apochromat 63X/1.40 NA DIC M27 (*pinhole* de apertura = 1.0 Unidad Airy), un objetivo Zeiss Plan-Apochromat 20X/0.8 NA y el software Zeiss ZEN 2010. La fluorescencia se adquirió secuencialmente utilizando diferentes láseres para la excitación y diferentes fotomultiplicadores para la detección de todas las señales de fluorescencia.

2.3. Riñón.

Tras el sacrificio, se extrajo el riñón derecho de los ratones y se fijó en PFA al 4% a 4°C durante 48 horas. Para la inclusión del tejido en parafina, se comenzó por una incubación del tejido en formaldehído durante una hora, seguida de una de 45 minutos en etanol. Tras esto se realizaron incubaciones sucesivas de una hora en soluciones de etanol de concentraciones crecientes hasta alcanzar etanol absoluto, terminando con una última incubación de una hora en xileno antes de la inclusión del tejido en parafina.

2.3.1. Tinción renal.

Creado el bloque, se realizaron cortes de 3 μ m de grosor y las secciones se tiñeron con los reactivos de ácido peryódico-Schiff (PAS, del inglés *Periodic acid Schiff*).

Brevemente, esta tinción incluye incubaciones sucesivas de cinco minutos en xileno, etanol al 70% y agua destilada, tras lo que las laminillas se ponen en contacto con el ácido peryódico al 0.5% a temperatura ambiente durante 25 minutos. Posteriormente, las láminas se tiñen con el reactivo de Schiff durante 40 minutos a temperatura ambiente y se lavan con agua corriente para realizar un contraste final de 5 segundos con hematoxilina.

2.3.2. Evaluación del daño renal (puntuación glomerular).

La caracterización del daño renal se llevó a cabo mediante una **evaluación ciega** de las micrografías ópticas a 10X de, al menos, cinco imágenes de cada muestra. En función de las alteraciones que se encontraran en las laminillas analizadas, se asignó un valor de puntuación glomerular, usando así un sistema semicuantitativo de la magnitud de la lesión.

Las imágenes que presentaban **hipercelularidad mesangial o endocapilar** se evaluaron como **grado 1**. A las imágenes con estructuras de ‘**medias lunas**’ o ‘**asas de alambre**’, indicadores de depósitos subendoteliales de inmunocomplejos, en menos de un 50% de los glomérulos analizados se les asignó una **puntuación de 2**. Cuando estas estructuras se observaron en un 50% o más de los glomérulos analizados, o cuando se encontraron **alteraciones en los bucles capilares** en menos de un 50% de los glomérulos, la imagen se catalogó de **grado 3**. Si los bucles capilares de un 50% o más de los glomérulos estudiados presentaban alteraciones en ausencia de tejido cicatricial ni daño tubular notable, la **puntuación fue de 4**. Por último, aquellas imágenes con **necrosis celular, tejido cicatricial y daño tubular remarcable** se clasificaron en el **grado 5**. Todas las micrografías que presentaron una **estructura normal de glomérulos**, sin infiltración, hipercelularidad o deformación de los espacios intersticiales fueron definidas como **grado 0**.

2.4. Procesamiento de heces y aislamiento de bacterias fecales.

La materia fecal se disolvió en PBS 1x estéril a una concentración de 100 mg de heces/ml PBS. La solución resultante se centrifugó a 187g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de alimentos no digeridos, paso tras el cual se seleccionó el sobrenadante, que contenía las bacterias, y se descartó el sedimento. Las bacterias fecales se centrifugaron a 2020g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo independiente donde se mezcló con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se almacenó a -20°C para la medida de IgA no unida a bacterias por ELISA.

Las bacterias se lavaron dos veces con 0.5 ml de PBS 1x al 1% de BSA estéril para su análisis.

3. Ensayos celulares.

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Los experimentos que incluyeron el uso de bacterias de la cepa *B. acidifaciens* o *P. distasonis* se llevaron a cabo gracias a la colaboración con el Dr. Abelardo Margolles del Instituto de Productos Lácteos de Asturias. En su laboratorio, se crecieron las cepas de *B. acidifaciens* DSM15896 y *P. distasonis* DSM20701, obtenidas inicialmente del Instituto alemán Leibniz DSMZ en consorcio con la Colección de Microorganismos y Cultivos Celulares GmgH.

Para el cultivo de *B. acidifaciens* se usó un medio al 50% (relación volumen-volumen, v/v) de medio de infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd) y un 50% (v/v) de medio clostridial reforzado (Oxoid Ltd), suplementado con un 5% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (Sigma). La cepa de *P. distasonis* se creció en el medio

anaeróbico Gifu (HiMedia Laboratories). El proceso de cultivo fue similar para ambas bacterias, iniciándose con un cultivo en superficie de placas de agar a 37°C en cámara anaeróbica MG500 (Don Whitley Scientific; atmósfera compuesta por 10% (v/v) de H₂, 10% de CO₂ y 80% de N₂) durante 48 horas. Transcurrido este periodo, las UFC, visiblemente aisladas sobre la placa de agar, se inocularon en medios líquidos y se incubaron por la noche, dando lugar a los precultivos usados para la preparación de los caldos de cultivo en volúmenes mayores, suplementados con trehalosa.

Los resultados de esta proliferación y sobrecrecimiento bacteriano posibilitaron la creación de un almacenaje de bacterias que se conservó a -80°C hasta su uso. Además, en estos procesos, la identidad de los diferentes grupos de bacterias fue confirmado mediante la secuenciación del gen 16S de ARNr, utilizando las secuencias iniciadoras:

27F ³¹³	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'.
1429R ³¹⁴	5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'.

3.2. Citometría de flujo.

Este trabajo tiene un alto componente de caracterización molecular de superficie e intracelular en células inmunitarias de ratón y en células bacterianas. Este proceso se ha llevado a cabo por técnicas de citometría de flujo, mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales y la adquisición en un citómetro Canto II (BD) o un citómetro FACSymphony (BD) y su posterior análisis utilizando los *software* FlowJo.

En los análisis relativos a células inmunitarias se adquirieron un total de 100.000 eventos, y en el caso de las bacterias, 300.000 eventos.

3.2.1. Análisis de células inmunitarias.

La tinción de células inmunitarias obtenidas de bazo, lámina propia intestinal y placas de Peyer se realizó en placas de 96 pocillos. Inicialmente, las células se tiñeron con el marcador de viabilidad Aqua (ThermoFisher Scientific) a una dilución 1:1000

en PBS 1x, paso tras el que se bloquearon con el anticuerpo anti-CD16/CD32 (Biolegend) a una dilución 1:100 en PBS 1x/EDTA 2 mM/ BSA 0.5% para evitar que los receptores de fracción constante generaran uniones inespecíficas con el resto de los anticuerpos.

Realizado este paso, se procedió a la tinción de proteínas de membrana de las células mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales. Para la tinción de moléculas intracelulares, las células se permeabilizaron mediante el reactivo *Cytofix/Cytoperm* de BD y se tiñeron con los anticuerpos monoclonales de interés. En la **Tabla 5** se detallan todos los anticuerpos usados para la tinción de células inmunitarias y su caracterización molecular.

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales usados para la caracterización molecular de las células inmunitarias. Listado de anticuerpos usados de forma combinada en paneles de caracterización celular para estudiar los marcadores de superficie e intracelulares de las células inmunitarias de ratón.

Caracterización de células inmunitarias			
EXTRACELULAR			
Diana	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
CD19	FITC/BV605	6D5	Biolegend
B220	eF450/PE-TxRed/FITC	RA3-6B2	Biolegend
CD45	APC	30-F11	Biolegend
TCR	PerCP Cy5.5	H57-597	Biolegend
GL7	PE	GL-7	Biolegend
CD95	PE-CF594	JO2	Biolegend
IgD	PE Cy7	11-26c	Biolegend
CD3	Pe Cy7	17 ^o 2	Biolegend
F4/80	PE Cy7	BM8	Biolegend
CD138	PerCP Cy5.5	28 1-2	Biolegend
INTRACELULAR			
IL-10	PE Cy7	JES5-16E3	Biolegend
IgA	PE	F1613-XN79B	Southern Biotech

Todos los anticuerpos se adicionaron a una dilución 1:200 en PBS 1x/EDTA 2 mM/BSA 0.5% y se incubaron con las células en oscuridad durante 15 minutos a 4°C. Entre cada paso de tinción, las células fueron lavadas con 200 µl de PBS 1x/EDTA 2 mM/BSA 0.5% mediante centrifugados de 300g de 5 minutos a 4°C.

El inmunofenotipado llevado a cabo en este trabajo se ha centrado principalmente en el análisis de **células B**, para lo cual todas las estrategias de identificación celular partieron de la selección de los eventos **TCR⁻/CD3⁻/F480⁻**. Para la medida de las células **B totales**, se seleccionaron aquellos eventos **CD19⁺/B220⁺**, y el análisis de la población **B de centro germinal** incluyó aquellas células **CD19⁺/GL7⁺/CD95⁺**. La caracterización de las células plasmáticas intestinales se subdividió en la caracterización de las **células plasmáticas de vida corta productoras de IgA (B220⁺/IgA⁺)** y **células plasmáticas de vida larga productoras de IgA (B220⁻/IgA⁺)**. Por último, las células **B productoras de IL-10** se evaluaron, tanto *ex vivo* como tras experimentos de estimulación *in vitro* como aquellas células **CD19⁺/B220⁺/IL-10⁺**.

3.2.2. Análisis de la respuesta de inmunoglobulinas en suero frente a bacterias fecales autólogas y *B. acidifaciens*.

Para la caracterización **del pegado de IgM, IgA e IgG2c circulantes** en suero hacia las **bacterias fecales** o hacia bacterias *B. acidifaciens* purificadas, se partió de ambas soluciones de bacterias ajustadas a una concentración de 4x10⁹ bacterias/ml y se plaquearon 25 µl (equivalentes a 10⁸ bacterias) en pocillos de una placa de 96.

Para la evaluación de la respuesta autóloga frente a las bacterias de la microbiota intestinal, se añadieron 25 µl de suero de ratones WT o TLR7Tg a cada pocillo conteniendo bacterias aisladas de las heces de su mismo genotipo y se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C.

En el caso de los experimentos de suero de ratones WT o TLR7Tg con bacterias purificadas de la especie *B. acidifaciens*, se usó el mismo número de bacterias y se incubó en las mismas condiciones.

Después de la incubación, las bacterias se centrifugaron a 1160g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron con PBS 1x/BSA 1%. Para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos de detección y disminuir el error, se bloquearon las muestras con suero de la especie productora de los anticuerpos de detección, en este caso rata, al 20% en PBS 1x/BSA 1%. Posteriormente, se lavaron las bacterias y se añadieron los anticuerpos de detección de cada isotipo diluidos 1:40 en PBS 1x/BSA 1%. Los anticuerpos usados para la caracterización de las inmunoglobulinas de cada isotipo pegados a las bacterias totales o a bacterias purificadas de *B. acidifaciens* se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales usados para la caracterización de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas pegadas a la superficie de las bacterias. Listado de anticuerpos usados de forma individual para estudiar la respuesta inmunitaria del huésped hacia las bacterias de la microbiota o bacterias purificadas de la especie *B. acidifaciens*.

Caracterización de inmunoglobulinas en superficie de bacterias			
Diana	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
IgA	PE	1040-09	Southern Biotech
IgM	APC	11/41	eBioscience
IgG2c	biotina	1078-08	Southern Biotech
Estreptavidina	APC	7105-11L	Biologend
ADN bacteriano	FITC	SytoBC	Invitrogen

Para la detección de la IgG2c, se realizó una incubación extra con estreptavidina acoplada a APC diluida 1:160 en PBS 1x/BSA 1%. Se realizó entonces un lavado y se tiñeron las soluciones bacterianas con 200 µl de SytoBC diluido 1:1000 en PBS 1x/BSA 1%. Finalmente, se fijaron las bacterias con PFA al 2% en PBS 1x durante 30 minutos a 4°C y, tras un lavado, se adquirieron en el citómetro.

3.2.3. Caracterización del pegado de IgA en bacterias fecales *ex vivo*.

El análisis de la cobertura de las bacterias fecales por IgA en el tracto gastrointestinal se llevó a cabo mediante la **caracterización *ex vivo* del nivel de pegado de IgA** de las bacterias aisladas de las muestras fecales. Para ello, las bacterias ya purificadas del contenido fecal se resuspendieron en 100 μ l y se transfirieron a pocillos de una placa de 96, donde fueron centrifugadas a 1160g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano fue resuspendido y bloqueado mediante la adición de 200 μ l de PBS 1x/BSA 1% con 20% de suero de rata. Nuevamente, con este cóctel se asegura que la unión del anticuerpo de detección sea específica y no se den uniones de baja avididad que puedan generar ruido en la señal. Las muestras bloqueadas se lavaron con 200 μ l de PBS 1x/BSA 1% y se añadió el anticuerpo anti-IgA APC (eBioscience) diluido 1:40 en PBS 1x/BSA 1%. Transcurrida esta incubación, las bacterias se lavaron nuevamente y se tiñeron con 200 μ l de SytoBC diluido 1:1000 en PBS 1x/BSA 1%, paso tras el cual las muestras se fijaron con PFA al 2%, se lavaron por última vez y se resuspendieron en 200 μ l para su adquisición en el citómetro. Todas las incubaciones de este protocolo se realizaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad.

3.2.4. Experimento de especificidad: AUC.

Para determinar la **especificidad de los anticuerpos** del suero de ratones TLR7Tg y WT contra *B. acidifaciens* se realizó un ensayo de titulación de sueros frente a dicha bacteria o frente a una bacteria no relacionada y ausente en la microbiota de ambos genotipos (*P. distasonis*), a modo de control negativo. Para ello, se los sueros de ratones WT o TLR7Tg fueron previamente incubados a 56°C durante una hora para inactivar el complemento y se diluyeron a títulos de 1:2, 1:5, 1:10 y 1:50 en PBS 1x/BSA 1%. Los sueros (25 μ l) y las bacterias de *B. acidifaciens* o *P. distasonis* (10^8 células microbianas) se incubaron durante toda la noche a 4°C. Para cada dilución de suero, se midió el

pegado de IgM por citometría de flujo como se ha descrito en el apartado 3.2.2, se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés *Median fluorescence intensity*) y se determinó el **área bajo la curva** (AUC del inglés *Area under the curve*) para cada genotipo con cada una de las bacterias, siguiendo la metodología descrita por Danska et al³¹⁵.

3.3. Aislamiento de células B y cultivos *in vitro*.

Para los experimentos de aislamiento de células B de los diferentes órganos linfoides (bazo, placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) se usó el kit de StemCell para la purificación de células B de ratón *Easysep* por selección negativa, siguiendo el protocolo y las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células se bloquearon con suero de rata y se incubaron con el cóctel de anticuerpos acoplados a esferas magnéticas. La combinación de anticuerpos incluida en el kit asegura la retención de células T, células dendríticas y macrófagos hasta conseguir un **94-98% de pureza de células CD19⁺** en la solución resultante.

Las células B aisladas se transfirieron al medio de estimulación, compuesto de RPMI (Gibco), penicilina y estreptomina, aminoácidos no esenciales y β -mercaptoetanol.

Para la **estimulación con *P. distasonis* y *B. acidifaciens*** se pusieron en contacto 10^5 células purificadas con una u otra bacteria en un ratio de 10 células inmunitarias por cada célula bacteriana en una placa de 96 pocillos. Este cultivo se mantuvo durante 48 horas, añadiéndose al medio durante las últimas 4 horas formol-12-miristato-13-acetato (PMA), ionomicina y monensina a concentraciones de 50 ng/ml, 500 ng/ml y 1 μ l/ml, respectivamente.

4. ELISAs.

4.1. ELISA para la detección de anticuerpos.

La evaluación de los títulos de **anticuerpos con reactividad hacia el ADNdc** se llevó a cabo mediante ELISAs desarrollados por el laboratorio. En ellos, placas de 96 pocillos de ELISA (ThermoFisher Scientific) fueron pretratadas con 100 μ l de sulfato de protamina (Sigma) a 500 μ g/ml durante 45 minutos a 4°C, tiempo tras el cual se añadieron 75 μ l de ADNdc obtenido de timo de ternero (Sigma Aldrich) a cada pocillo. Esta solución se dejó incubar primero a 37°C durante dos horas en agitación y, posteriormente, toda la noche a 4°C, generándose así la capa de captura del ELISA. Pasado este tiempo, las placas de ELISA se lavaron 5 veces con PBS 1x con Tween 20 al 0.05%. A la mezcla de lavado de PBS con Tween 20 se hará referencia de aquí en adelante en este trabajo como PBST. Tras lavar la placa, se añadieron las muestras de suero a diluciones de 1:2000 en PBST/BSA 1% para la detección de los isotipos **IgM**, **IgG total e IgG2c**. Las muestras se incubaron durante dos horas a 37°C, se lavaron dos veces con PBST y se añadió el anticuerpo de detección de isotipo para su incubación durante 30 minutos a 37°C. En el caso de la IgG total, se usó un anticuerpo de detección directamente acoplado a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés *Horseradish peroxidase*) diluido 1:1000 en PBST/BSA 1% (Southern Biotech). Para la detección de IgG2c se usó un anticuerpo biotinilado diluido 1:1000 en PBST/BSA 1% (Southern Biotech). Terminada esta incubación, las placas se lavaron cuatro veces con PBST y se procedió a la adición de la enzima HRP acoplada a estreptavidina (diluida 1:100 en PBST/BSA 1%, Southern Biotech) solo en el caso de detección de IgG2c, que se dejó incubar con este complejo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras cuatro lavados con PBST, se adicionó a ambas placas el sustrato colorimétrico de la enzima HRP, el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB,

Invitrogen), a temperatura ambiente. Al entrar en contacto, sustrato TMB sufre una transformación catalizada por la enzima HRP por la cual vira hasta el color azul generando una intensidad directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos al ADNdc del isotipo que se desee medir. Para su cuantificación, esta reacción química fue frenada después de 10 minutos mediante la adición de H_2SO_4 2N (Sigma). El cambio del pH en la solución inhibe la acción catalítica de la enzima e induce un viraje de color, dando lugar a un amarillo estable durante, aproximadamente, media hora. En este punto se midió la densidad óptica (OD, del inglés *Optical density*) a 450 nm y se eliminó la señal de fondo a 570 nm usando un lector de placas *Infinite200Pro*.

Para el **ensayo de inhibición** del pegado de autoanticuerpos al ADNdc mediante la **preincubación con bacterias**, las muestras de suero diluidas 1:1000 en PBST/BSA 1% se incubaron con 25, 10, 5 o 1×10^4 bacterias *B. acidifaciens* en un volumen total de 200 μl . Como control positivo, se preincubó el suero con la solución usada para realizar las diluciones de las bacterias (PBST/BSA 1%). Se dejó que las inmunoglobulinas se unieran a las bacterias durante dos horas a 4°C, tiempo tras el cual se centrifugaron las bacterias a 1160g durante 5 minutos a 4°C y se recolectaron los sobrenadantes para determinar los niveles **de IgM, IgG total e IgG2c por ELISA de autoanticuerpos**, como se ha descrito anteriormente. Los valores de OD se normalizaron sobre el obtenido con las muestras de suero preincubadas con PBST/BAS 1% para calcular el porcentaje de inhibición.

4.2. ELISA para la detección de inmunoglobulinas totales.

La medida de inmunoglobulinas en suero y sobrenadantes fecales para la detección de **IgA, IgM, IgG total e IgG2c** se llevó a cabo mediante el uso de kits comerciales (Invitrogen). Brevemente, las placas de ELISA de 96 pocillos se cubrieron con los anticuerpos de captura de cada isotipo y se dejaron incubar durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBST y bloquearon y se añadieron las muestras

de suero o sobrenadante fecal diluidas en el tampón indicado en cada kit y se incubaron en la placa durante dos horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero se diluyeron 1:100 para la detección de IgG2a, 1:5000 para la IgG total, 1:50000 para la IgM y 1:500 para la IgA. Los sobrenadantes fecales, por su parte, se diluyeron 1:50 para la medida de IgA libre. Pasadas las dos horas, las placas se lavaron nuevamente y se adicionaron a cada pocillo los anticuerpos de detección correspondientes, que se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron cuatro lavados, se añadió el TMB y, pasados diez minutos, se frenó la reacción con H_2SO_4 2N. La OD se midió como se ha descrito en el punto 4.1.

4.3. ELISA de bacterias fecales con sueros autólogos y heterólogos

Para medir los **anticuerpos séricos con reactividad hacia las bacterias fecales de isotipo IgM, IgA, e IgG2c**, se procesaron 150 mg de heces de ratones WT o TLR7Tg en PBS 1x estéril que fueron seguidamente filtradas por mallas de 40 μm . El homogeneizado se procesó como se ha descrito en el punto 2.4 para aislar las bacterias, las cuales fueron sometidas a un proceso de inactivación por calor mediante su incubación a 85°C durante una hora. Con este paso se aseguró que todos los pocillos contuvieran, una vez plaqueadas, el mismo número de bacterias durante el desarrollo de todo el experimento, sin fenómenos de proliferación. El resultado de esta inactivación se llevó a un volumen final de 20 ml, del cual se plaquearon 100 μl en cada pocillo usando placas de ELISA de 96 pocillos. Para su asentamiento y pegado al fondo de la placa, se incubaron durante toda la noche a 4°C y, a la mañana siguiente, se lavaron cuatro veces con PBST. En este punto se añadieron las muestras de suero diluidas en PBST/BSA 1% a 1:400 para la detección de IgM, 1:20 para IgG2c y 1:100 para IgA, y se incubaron con las bacterias durante toda la noche a 4°C. Los sueros de

ratones WT o TLR7Tg se pusieron en contacto con bacterias asociadas a su mismo genotipo (**ELISA autólogo**) o al genotipo del otro grupo (**ELISA heterólogo**), con el objetivo de comparar el pegado de una misma muestra de suero hacia sus propias bacterias o al perfil de bacterias del grupo con el que se quiere comparar.

Tras la incubación de los sueros con las bacterias fecales, se lavaron las placas cuatro veces con PBST y se añadieron los anticuerpos de detección acoplados a HRP diluidos en PBST/BSA 1% a una dilución de 1:6000 para IgM (BD Biosciences), 1:10000 para IgG2c (Southern Biotec) y 1:6000 para IgA (Southern Biotec). Estos anticuerpos se incubaron durante una hora y media a temperatura ambiente, tras lo cual las placas se lavaron, se revelaron con TMB seguido de H_2SO_4 y se midió la OD como se ha descrito en el punto 4.1.

5. Análisis de la composición de la microbiota.

5.1. Análisis de la composición de microbiota basado en citometría de flujo.

5.1.1. Procesamiento de las muestras fecales.

En este trabajo se llevó a cabo de forma adicional un análisis por citometría de flujo de la microbiota intestinal adaptado de la metodología desarrollada por Chang H-D. et al (38705607), gracias a una estancia de tres meses en el Centro de Investigaciones Reumáticas Alemán (DRFZ, Berlín).

Para ello, las muestras fecales obtenidas de los diferentes modelos usados en el centro de investigación de origen en Granada se enviaron a Berlín a $-80^{\circ}C$ para su procesamiento. Las muestras se descongelaron en hielo, se pesaron y se homogenizaron en PBS 1x a una concentración de 1mg/ml. La materia fecal se filtró por una malla de $30\ \mu m$ y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml. Las bacterias en

solución se centrifugaron a 1160g durante 15 minutos a 4°C y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml de PBS1 x/NaCl al 0.9%. La concentración bacteriana de las diferentes muestras se normalizó mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm a una dilución 1:20 en PBS1 x/NaCl al 0.9%. La OD obtenida se ajustó a 0.4 usando la siguiente fórmula:

$$\frac{OD_{\text{deseada}} \times 1000}{OD_{600 \text{ nm}}} = \text{volumen } (\mu\text{l}) \text{ de solución bacteriana/ml}$$

Tras determinar el volumen original de suspensión de bacterias necesario, las muestras se llevaron a 1 ml de volumen final usando medio de congelación estéril (medio Luria Broth al 40% de glicerol) y se congelaron a -80°C hasta su tinción.

5.1.2. Tinción de bacterias y adquisición.

La tinción de las bacterias se realizó en tandas de entre 20 y 25 muestras por día. Para eliminar la posible variabilidad entre muestras procesadas en diferentes días derivadas de factores experimentales (denominada comúnmente como *batch effect*), se organizaron las muestras de forma que cada día hubiera representación de todos los grupos analizados.

Siguiendo esta organización, el descongelado de las muestras en hielo se facilitó mediante la adición de 1 ml de PBS 1x estéril a temperatura ambiente y las bacterias se centrifugaron a 1160g durante 15 minutos a 4°C y se resuspendieron en 100 μl de anticuerpo bloqueante de las regiones Fc anti-CD16/CD32 al 0.2% en PBS 1x/BSA 2%/ADNasa 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (mezcla referida como PBD en los siguientes pasos). Esta incubación se llevó a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente, y seguidamente se lavaron las bacterias con 1 ml de PBD. Las bacterias bloqueadas se resuspendieron en 50 μl y se transfirieron 5 μl de ese volumen para la tinción de los paneles usados para la caracterización de la respuesta inmunitaria (panel de inmunoglobulinas) y para la caracterización de azúcares de superficie (panel de

lectinas). Los anticuerpos y lectinas incluidos en cada panel, así como la concentración, clon y casa comercial de cada uno de ellos, se detalla en la **Tabla 7**.

Las diluciones de los diferentes anticuerpos monoclonales y lectinas se prepararon, para cada panel, en un volumen de 95 μl y se incubaron con 5 μl de bacterias, creando así un volumen final de 100 μl que se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Tras esta incubación, se añadió a cada muestra 1 ml de Hoechst 3342 5 μM en PBD, y se incubaron las bacterias durante otros 30 minutos en las mismas condiciones. Finalmente, los tubos se lavaron con 2 ml de PBS 1x/BSA 2% y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1x para su adquisición en el citómetro.

Tabla 7. Moléculas usadas para los paneles de la caracterización de la microbiota por citometría de flujo. Panel de inmunoglobulinas: listado de anticuerpos monoclonales usados para la caracterización del pegado de inmunoglobulinas de ratón en la superficie de las bacterias fecales. Panel de lectinas: listado de lectinas con reactividad a diferentes patrones de glucosilación usados para la evaluación de la presencia de estas estructuras en la superficie de las bacterias fecales. PNA: aglutinina de cacahuete (del inglés *Peanut agglutinin*); ConA: concanavalina A; WGA: aglutinina de germen de trigo (del inglés *Wheat germ agglutinin*); STL: lectina de *solanum tuberosum* (del inglés *solanum tuberosum lectin*).

Caracterización de superficie de bacterias fecales				
Panel de Inmunoglobulinas				
Diana	Fluorocromo	Concentración	Clon	Casa comercial
IgA	Dylight650	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	A90-103D5	BETHYL
IgG total	aF488	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	A11001	Invitrogen
Panel de lectinas				
PNA	FITC	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	29060	Biotium
ConA	APC	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	29020-1	Biotium
WGA	PE	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	29076-1	Biotium
STL	biotinilado	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	B-1165	Vector Laboratories/Biozol
Estrept.	PerCP	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Bio3-18E7	Miltenyi Biotech

A modo de control interno, una de las muestras procesadas se incluyó en cada día de tinción para evaluar la variación de la señal en los diferentes días de protocolo. Adicionalmente, se incluyeron muestras de ratones *Rag^{-/-}* como controles negativos para asegurar el pegado específico de los anticuerpos.

5.1.3. Análisis multiparamétrico a nivel de célula única de microbiota.

El análisis multiparamétrico de las bacterias se realizó con R, mediante el uso de los paquetes *flowWorkspace* y *OpenCyto* para la limpieza de los eventos en los archivos de citometría³¹⁶. Una vez eliminados los restos celulares y seleccionados aquellos positivos para Hoechst, se realizó un submuestreo aleatorio de 10.000 eventos por cada muestra y se aplicó un algoritmo de organización de poblaciones no supervisado (SOM, del inglés *self-organizing map*) sobre la concatenación de los eventos submuestreados. El algoritmo generó un total de 1024 poblaciones bacterianas, denominadas en este trabajo como *bins*. Para ello, el algoritmo tuvo en cuenta las propiedades de cada evento para los parámetros FSC, SSC, Hoechst y el resto de las características analizadas en cada panel, y generó una estrategia de selección agrupando aquellos eventos con un comportamiento más similar.

Para cada *bin* se generó un conteo bacteriano absoluto que fue transformado en frecuencia relativa. Sobre estos números se aplicó un test de Kruskal Wallis entre los grupos para cada modelo (modelo de IMQ con variante de *littermates*, modelo de IMQ con suplementación con *P. distasonis*, modelo espontáneo). La aplicación de la corrección de tasa de falso descubrimiento mediante el método de Benjamini-Hochberg sobre los valores de p generados permitió seleccionar las 20 *bins* con el menor valor de p. Estas *bins* son las representadas para cada modelo y panel en la sección de resultados de este trabajo.

Las frecuencias de cada una de estas poblaciones en las muestras analizadas se representaron en forma de mapas de calor realizados mediante el paquete *complexheatmap* de R.

Para los análisis de enriquecimiento en las comparativas por parejas, se representó mediante el *software* GraphPad cada población según su valor medio de señal para cada parámetro analizado por citometría de flujo, gracias a las coordenadas Kohonen. En paralelo, se calculó el cambio relativo de la frecuencia media de cada población entre dos grupos y se representó, mediante un código de color y diámetro, el sentido y valor absoluto de dicho cambio relativo.

5.2. Identificación taxonómica.

5.2.1. Aislamiento del ADN bacteriano y secuenciación del ARNr 16S.

La secuenciación de los taxones presentes en las heces se llevó a cabo partiendo de heces no procesadas para evitar posibles contaminaciones derivadas del manejo de la muestra. Las muestras fecales recogidas en esterilidad se procesaron por la Unidad de Genómica del centro de investigación GENYO, usando el kit QIAmp® Fast DNA Stool Mini “*Pathogen Detection*” (QUAcube/QIAGEN), el cual permite la extracción del ADN bacteriano. La calidad y cantidad del producto obtenido se evaluaron con NanoDrop (ThermoFisher).

El siguiente paso consistió en la generación de bibliotecas de amplicones para la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S, mediante el uso de cebadores universales de PCR para el gen 16S:

Fwd	5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG3'
Rvs	5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC3'

Las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se cuantificaron con Qubit (ThermoFisher). El producto se ajustó a una concentración de 50 ng/ muestra y las diferentes muestras se filtraron en una columna (Omega Bio-Tek) implementando el uso de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter) para evitar contaminación no genética en la etapa de secuenciación.

El control de calidad se realizó con un bioanalizador de alta sensibilidad (Agilent) para comprobar la eficacia de eliminación del DNA sobrante, como los cebadores no usados en la amplificación. El tamaño de la librería resultante fue de alrededor de 400 pares de bases (pb). Las muestras purificadas se diluyeron hasta una concentración de 4nM usando agua bidestilada y se cuantificaron nuevamente con Qubit, paso tras el cual se procedió a la secuenciación haciendo uso de los reactivos del kit MiSeq Reagent v3 en un sistema MiSeq y siguiendo los protocolos de Illumina.

5.2.2. Preprocesamiento de los datos generados por la secuenciación y alineamiento de OTUs.

El sistema de trabajo definido se llevó a cabo usando los lenguajes de programación R y Python, además del *software* QIIME2³¹⁷.

El primer paso se basó en el análisis de la calidad de las lecturas generadas en la secuenciación en su forma primitiva, utilizando para ello la opción *q2-dada2* de QIIME2³¹⁸ con límite de índice de Phred en Q20. Tras esto, la secuencia final de 50pb de cada lectura fue eliminada.

La identificación de los OTUs se llevó a cabo usando la opción *q2-vsearch* dentro de QIIME2³¹⁹, que permitió la agrupación de secuencias con un porcentaje de coincidencia superior al 99%. Los grupos generados se usaron en pasos posteriores para la clasificación taxonómica. Gracias a la inclusión de controles internos, se pudieron identificar los taxones correspondientes a contaminación ambiental

introducidos durante el manejo de las muestras, los cuales se eliminaron mediante el paquete *decontam* dentro de R³²⁰.

La anotación de las diferentes OTUs para su identificación se desarrolló mediante un clasificador taxonómico basado en *sklearn*, utilizando la opción *q2-feature-classifier* dentro de QIIME2, usando como referencia la base de datos GreenGenes v.13.8³²¹. Las secuencias para las que no se encontró una secuencia de referencia coincidente se denominaron secuencias no alineadas, y se sometieron a un proceso de filtrado para la construcción de un árbol filogenético basado en máxima verosimilitud. Para ello se usaron los algoritmos MAFFT y RAxML, dentro de las opciones *q2-alignment* y *q2-phylogeny* de QIIME2, respectivamente^{322,323}.

5.2.3. Análisis de diversidad.

La identificación de los taxones con el máximo grado de profundidad disponible llevó, en muchos casos, hasta el nivel de especie. Con la información obtenida, mediante la matriz de recuento de taxones y el árbol filogenético, se calcularon índices correspondientes a la alfa y beta diversidad microbianas.

La alfa diversidad se evaluó mediante los índices de diversidad filogenética de Faith, la Uniformidad de Pielou y el índice de Shannon. La beta diversidad, por otro lado, se estimó utilizando la disimilitud de Bray-Curtis, el índice de Jaccard y las distancias Unifrac ponderadas utilizando el análisis multivariado de permutaciones (PERMANOVA, del inglés *Permutational multivariate analysis of variance*). Este último parámetro se utilizó para el análisis por componente principal (PCA, del inglés *principal component analysis*) de las muestras.

La significancia de estos indicadores entre los diferentes grupos de muestras se evaluó mediante un test de Mann-Whitney no pareado cuando la comparativa se llevó a cabo entre dos grupos, y un test de Kruskal-Wallis al comprar tres o más grupos.

Finalmente, se aplicó un análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto (LEfSe, del inglés *Linear discriminant analysis effect size*) para evaluar de forma cuantitativa la contribución de cada taxón a las diferencias encontradas entre los ecosistemas microbianos comparados³²⁴, evaluándose la significancia del efecto por un test de Mann Whitney no pareado.

5.3. Medida de la translocación bacteriana.

La evaluación de la translocación de bacterias desde el lumen gastrointestinal hasta los ganglios linfáticos mesentéricos se llevó a cabo mediante la extracción de dichos órganos linfoides en condiciones de esterilidad y su congelación inmediata en nitrógeno líquido. Los ganglios se descongelaron en el momento de ser procesados mecánicamente para disgregar el tejido en una cabina de cultivos anaeróbica (atmósfera compuesta por 95% N₂/ 5% H₂). La suspensión celular se cultivó de forma inicial en 5 ml de medio anaeróbico Luria-Bertani suplementado con sangre de oveja, y se mantuvo en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 72 horas para permitir la proliferación de aquellas bacterias anaerobias estrictas. Tras este periodo, se tomó 1 ml del cultivo resultante, enriquecido en bacterias, y se procedió a la extracción y secuenciación del material genético microbiano siguiendo los pasos descritos en el apartado 5.2 de esta sección.

6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos y su representación se llevó a cabo utilizando el *software* GraphPad Prism 9.2.0 y R.

En los gráficos de barras, los datos representan el valor medio y la desviación estándar, y en aquellas gráficas de caja y bigotes, se optó por la representación del método de Tukey.

Las comparativas estadísticas mostradas en este trabajo se componen de test no paramétricos no pareados, indicándose en cada pie de figura el aplicado en cada caso. De forma general, las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo mediante la aplicación del Test de Mann-Whitney no pareado, mientras que en aquellos casos donde se compararon tres o más grupos se aplicó un Test de Kruskal Wallis. En todos ellos, se consideró significancia estadística cuando el valor de p obtenido fue inferior a 0.05.

La representación de la significancia estadística de dichos test se indica en cada figura en modo de asteriscos según el valor de p : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística (valores de p superiores a 0.05).

RESULTADOS

1. Caracterización del modelo murino mediado por la sobreexpresión de TLR7.

1.1. Los ratones TLR7Tg desarrollan una enfermedad autoinmune.

La sobreexpresión del receptor TLR7 ha sido descrita en otros modelos animales como única condición necesaria para la inducción de autoinmunidad³¹². Para caracterizar las alteraciones inducidas a nivel sistémico por la sobreexpresión de *Tlr7*, se usó un modelo genéticamente modificado que expresa entre 9 y 16 copias del gen (TLR7Tg) y se hizo un seguimiento temporal de la presencia de autoanticuerpos y la esplenomegalia. La cinética de la enfermedad se comenzó a medir a las 12 semanas de edad en ratones TLR7Tg y en controles WT del mismo género y edad y se continuó hasta las 32 semanas (Fig. 9A).

Los autoanticuerpos se definieron contra el ADNdc, midiéndose los niveles de IgG totales y el isotipo IgG2c por ser el más asociado con autoinmunidad³²⁵. Estos análisis reflejaron que los ratones TLR7Tg presentan niveles significativamente superiores de autoanticuerpos anti-ADNdc que los WT a las 20 semanas de edad para el isotipo IgG, y una tendencia similar, pero no significativa, para el isotipo IgG2c (Fig. 9B,C). A las 30-32 semanas de edad, los ratones TLR7Tg presentaron niveles significativamente mayores de anticuerpos anti-ADNdc para ambos isotipos (Fig. 9B, C). Además, el incremento de los autoanticuerpos anti-ADNdc se acentuó con la edad de forma significativa solo en los ratones TLR7Tg, mientras que se mantuvo comparable en los ratones WT con el envejecimiento.

En los ratones TLR7Tg la esplenomegalia se desarrolló de forma progresiva, siendo dos veces mayor que la observada en el grupo WT a las 12 semanas de edad y hasta 8 veces mayor a las 30-32 semanas de edad (Fig. 9D).

De forma conjunta, estos resultados indican que los ratones TLR7Tg presentan signos compatibles con un cuadro de autoinmunidad que se manifiestan desde edades tempranas y se agravan con el tiempo, siendo un modelo apropiado para el estudio del lupus.

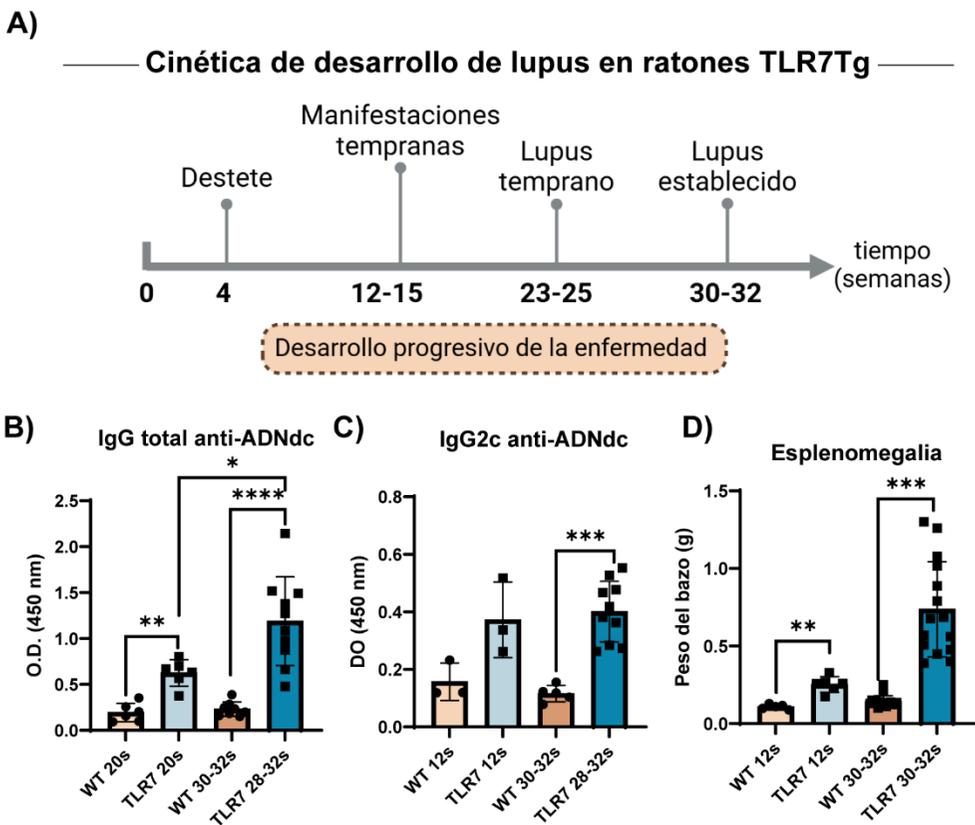


Figura 9. La sobreexpresión de Tlr7 induce un fenotipo de autoinmunidad. A) Descripción temporal del modelo espontáneo o TLR7Tg. B y C) Niveles de autoanticuerpos de isotipo (B) IgG total y (C) IgG2c anti-ADNdc en suero medidos por ELISA entre las 12 y 32 semanas de edad. D) Esplenomegalia caracterizada por la masa del bazo en el momento del sacrificio entre las 12 y las 32 semanas de edad. E) Ratio de masa corporal/masa del bazo a las 32 semanas de edad. N=3-10 ratones para cada grupo de edad y genotipo. B-D: Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

1.2. La sobreexpresión de TLR7 induce alteraciones inmunitarias y estructurales en el intestino.

Una vez caracterizados los efectos sistémicos de la sobreexpresión de TLR7, se procedió a analizar las alteraciones en el estado de la permeabilidad intestinal y en la respuesta inmunitaria en el GALT.

1.2.1. Los animales TLR7Tg presentan una permeabilidad intestinal incrementada.

El estudio del estado de la barrera intestinal en este trabajo se realizó mediante el uso del dextrano acoplado a FITC para medir la permeabilidad paracelular intestinal *in vivo* (Fig. 10A). Los ratones TLR7Tg presentaron un incremento significativo en la permeabilidad intestinal tanto a las 23-25 como a las 30-32 semanas de edad, con una mayor transferencia del dextrano desde el lumen intestinal a sangre periférica (Fig. 10B).

Dado que integridad de la barrera intestinal está directamente relacionada con las uniones intercelulares TJ, se procedió a analizar por inmunofluorescencia la expresión de dos de las proteínas que conforman estas uniones: claudina-1 y ocludina.

En el íleon de los ratones TLR7Tg de 30-32 semanas de edad, se observó que la claudina 1 presentaba un patrón de expresión con forma vesicular y acumulación en el citoplasma celular (Fig. 10C). Esta distribución difiere significativamente de la observada en los ratones WT de la misma edad, donde la proteína se encontró distribuida por el epitelio del íleon presentando coexpresión con el marcador de membrana de células epiteliales Ep-CAM1 (Fig. 10C). De forma similar, la ocludina presentó el mismo patrón de expresión y localización en el epitelio ileal de los ratones TLR7Tg en comparación con los controles WT (Fig. 10D). En estas imágenes resulta de especial interés que la expresión de la ocludina en los ratones WT muestra una

acumulación en la zona de las criptas epiteliales, mientras que en el íleon de los ratones TLR7Tg, hay un patrón de expresión hacia el lumen intestinal (Fig. 10E).

La medida de la funcionalidad y la estructura del epitelio en el íleon de los ratones TLR7Tg permite concluir que el cuadro sistémico de autoinmunidad induce a nivel intestinal una disrupción en la homeostasis de la barrera intestinal. De forma concomitante, estos ratones presentan cambios en la distribución celular de las proteínas implicadas en la formación de las uniones intercelulares TJ.

1.2.1. Caracterización de la función inmunitaria en el GALT.

Para tener una mejor descripción de las implicaciones de la sobreexpresión de TLR7 en el intestino, se analizó la respuesta inmunitaria en las diferentes estructuras del GALT: PP y SILP.

La inflamación sistémica observada en el grupo TLR7Tg también se manifestó a nivel intestinal con una alteración en la estructura celular de las PP. En los ratones WT, la zona de células B apareció como un área céntrica, regular y compacta, delimitada del resto de tipos celulares, mientras que en las PP de los ratones TLR7Tg se observó que las células B aparecieron con un patrón disperso de forma irregular y discontinua y de mayor dimensión (Fig. 11A). Además, la cuantificación de la densidad de células B en las áreas foliculares mostró un incremento significativo de estas áreas en los ratones TLR7Tg en comparación con los ratones WT (Fig. 11B).

La proliferación excesiva de células B se da como consecuencia de una actividad elevada en los CGs. Por ello, se analizaron los marcadores de CG en la superficie de células B (GL7 y CD95) por citometría de flujo e inmunofluorescencia. Los ratones TLR7Tg de 30-32 semanas de edad presentaron en sus PP frecuencias significativamente mayores de células CD19⁺ CD95⁺ GL7⁺ en comparación con los controles WT (Fig. 11C, D).

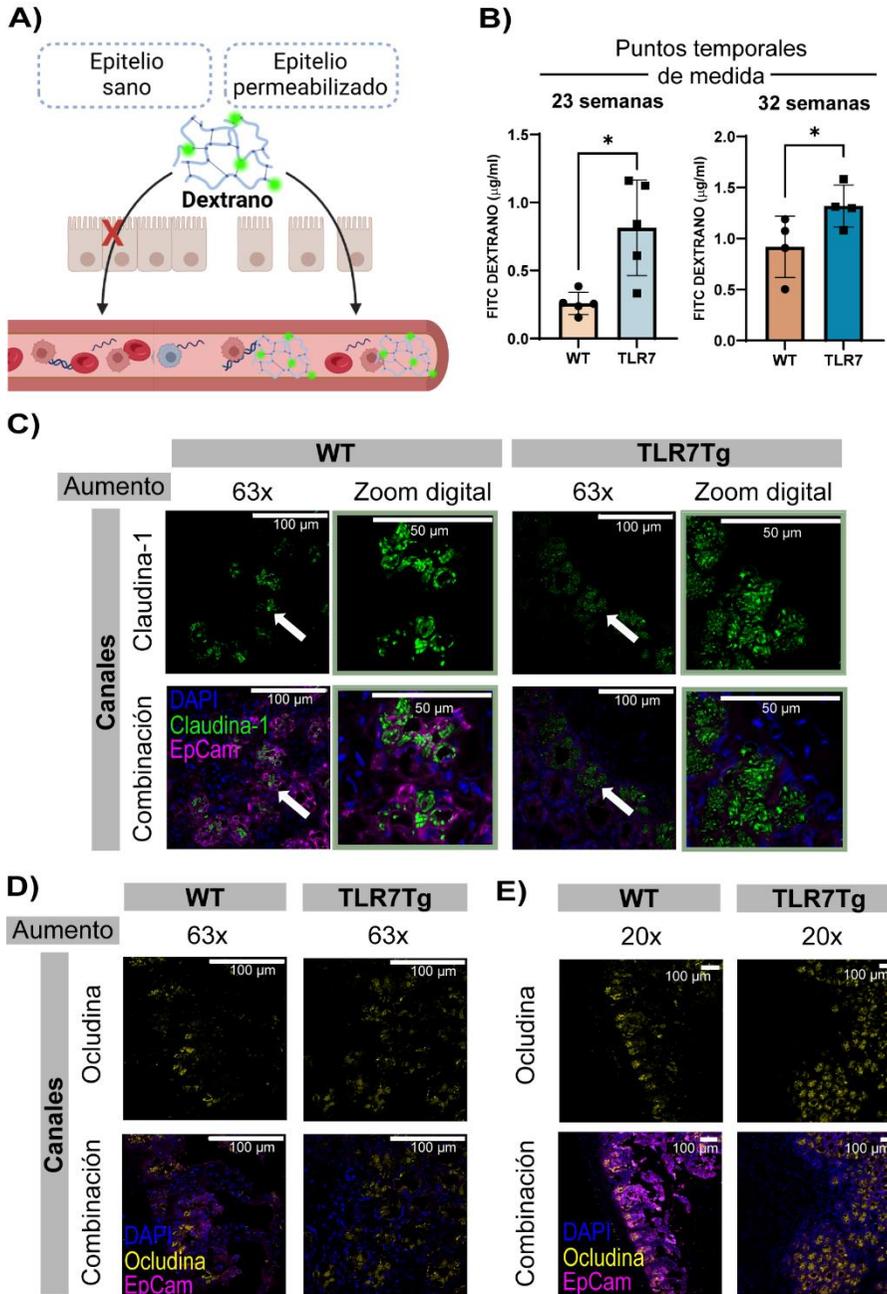


Figura 10. Los ratones TLR7Tg presentan permeabilidad intestinal acompañada de cambios en la expresión de proteínas de unión intercelular. A) Ilustración del funcionamiento de la evaluación de la permeabilidad intestinal *in vivo* mediante el uso de un dextrano acoplado a FITC. Si la función barrera se ve comprometida, el dextrano se absorbe de forma paracelular y se puede encontrar en sangre. B) Cuantificación *in vivo* de la permeabilidad

intestinal a las 23 y 32 semanas de edad. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con n=5-7 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD. C-E) Tinción representativa del patrón de expresión de (C) Claudina-1 y (D y E) Ocludina en cortes transversales del íleon distal de ratones control y TLR7Tg realizada por microscopía confocal con los aumentos especificados. C) La fecha blanca marca la zona sobre la que se aplicó un zoom digital (2.0). Todas las imágenes fueron capturadas usando un objetivo Zeiss Plan-Apochromat 63X/1.40 NA en aceite de inmersión DIC M27 (apertura de pinhole= 1.0 AU) o un objetivo 20X/0.8. N=3-10 ratones para cada grupo de edad y genotipo. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

En el bazo de estos ratones se observó un comportamiento similar (Fig. 11E), indicando que la evolución de la respuesta inmunitaria intestinal se desarrolla de forma paralela a la generada en el bazo por la sobreexpresión de TLR7.

Finalmente, se evaluó si la actividad y expansión elevada de las células B en los ratones TLR7Tg de 30-32 semanas se traducía en cambios en la respuesta IgA, por ser este el isotipo predominantemente secretado en la respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal³²⁶. Coetáneamente al completo desarrollo del lupus se dio también un incremento significativo de las células B220⁺ IgA⁺ en las PP y SILP de los ratones TLR7Tg en comparación con los WT (Fig. 11F). Las células B de vida larga productoras de IgA (B220⁺ IgA⁺), sin embargo, se mantuvieron en niveles comparables en la SILP de ambos grupos de animales, y mostraron un ligero incremento (que no alcanzó la significación estadística) en los ratones TLR7Tg (Fig. 11F). El aumento global de la respuesta IgA en las PP de los ratones con lupus establecido se confirmó además por inmunofluorescencia (Fig. 11A). Para evaluar si el cambio a nivel celular se traducía en un aumento en la secreción de IgA al lumen intestinal, se evaluaron a continuación la IgA unida a bacterias fecales y las concentraciones libres de esta inmunoglobulina en sobrenadantes fecales. A edades tempranas (12 semanas), ratones TLR7Tg y WT presentaron niveles de IgA comparables; sin embargo, con el desarrollo

y establecimiento progresivo de la enfermedad (20 semanas), la concentración de IgA libre se incrementó rápida y significativamente en los TLR7Tg, pero no en los WT, manteniéndose elevada y significativamente mayor que en los controles WT hasta las 32 semanas de edad (Fig. 11G). Los niveles de IgA unida a la microbiota intestinal, sin embargo, fue similar entre ambos genotipos tanto a las 15 como a las 32 semanas de edad (Fig. 11H).

Estos análisis indican que la sobreexpresión de TLR7Tg induce un cambio de la respuesta IgA intestinal y en la permeabilidad de la barrera intestinal, pero no altera los niveles globales de cobertura de las bacterias fecales por la IgA secretada.

1.3. El desarrollo del lupus mediado por TLR7 induce disbiosis intestinal.

La IgA secretada por las células inmunitarias del intestino está implicada, entre otras funciones, en el control de la composición bacteriana intestinal³²⁷, por lo que se hipotetizó que los cambios observados en la respuesta celular y humoral de IgA en los ratones TLR7Tg podría traducirse en alteraciones de la microbiota. Por ello, se procedió a analizar la composición de la microbiota fecal en ratones WT y TLR7Tg de 30-32 semanas de edad mediante secuenciación del ARNr 16S.

En primer lugar, la alfa diversidad se caracterizó mediante la distancia filogenética de Faith, la uniformidad y el índice de Pielou. Brevemente, la distancia filogenética de Faith hace referencia a la relación evolutiva entre las diferentes especies de una muestra; la uniformidad informa sobre la representación dominante o distribución equitativa de las especies encontradas; y el índice de Pielou indica el número de especies presentes en un ecosistema y la abundancia relativa de cada una de ellas³²⁸. Los resultados de los análisis de la alfa diversidad mostraron la ausencia de diferencias significativas entre WT y TLR7Tg (Fig. 12A, B).

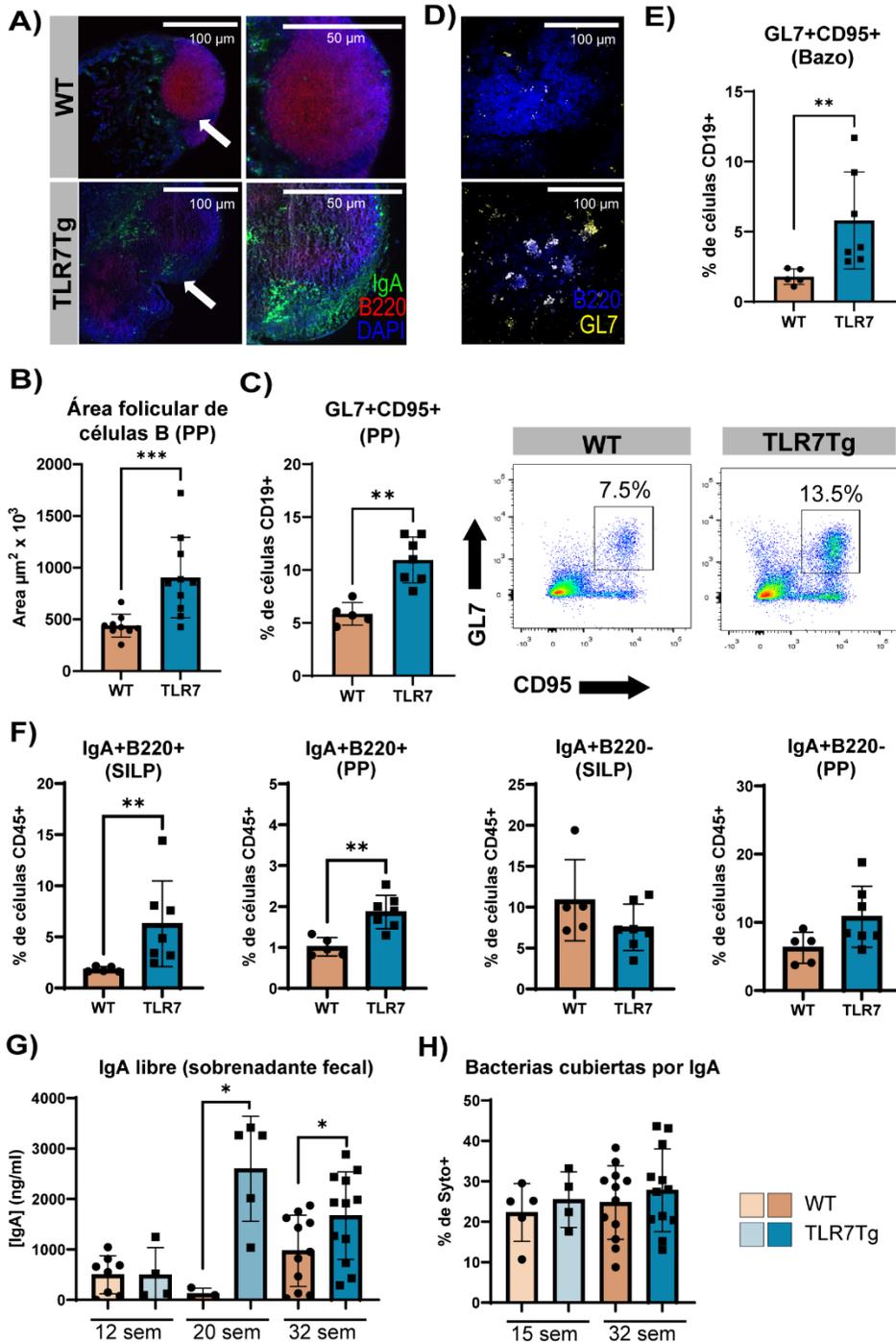


Figura 11. La sobreexpresión de Tlr7 modifica la respuesta inmunitaria intestinal.
 A) Tinción representativa de la localización de células B220+ (rojo) e IgA+ (verde) en secciones longitudinales de PP de ratones WT (arriba) y TLR7Tg (abajo) realizada por microscopía confocal. La flecha blanca marca la zona sobre la que se aplicó un zoom digital (2.0) sobre la foto original. B)

Cuantificación de las células B (caracterizadas por la expresión de B220) por cada μm^2 (WT n=9; TLR7Tg n=10). C) Representación de la frecuencia de células B de centro germinal (GL7+ CD95+) en las placas de Peyer. A la derecha, gráficas de citometría de flujo representativas de cada genotipo (WT n=5; TLR7Tg n=7). D) Tinción representativa de las células B220+ (azul) GL7+ (amarillo) en PP de ratones WT (arriba) y TLR7Tg (abajo). E) Medida de la frecuencia de células B de centro germinal en el bazo. F) Caracterización por citometría de flujo de células IgA+ B220+ e IgA+ B220-PP y SILP (WT n=5; TLR7Tg n=7). G-H) Respuesta IgA en ratones WT y TLR7Tg a las 15, 20 y 32 semanas de edad: concentración de IgA libre en sobrenadantes fecales (G) y frecuencia de bacterias fecales cubiertas de IgA (H). PP: placas de Peyer, SILP: Lámina propia del intestino delgado. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes con n=10-12 ratones por grupo. Las imágenes en A) y D) fueron capturadas usando los objetivos ZEISS Axiocam 506 mono 5X/0.15 y 10X/0.45. A-F) Todas las gráficas representan datos de ratones de 32 semanas de edad. B-C, E-H) Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

Por otro lado, la beta diversidad se determinó a través de un análisis PCA (Fig. 12C) con comparativa par a par mediante PERMANOVA (Fig. 12D). Estos parámetros comparan la composición de la microbiota en términos de identidad de especies, proporcionando información sobre la diferencia en la composición de los ecosistemas³²⁸. La representación bidimensional del PCA (Fig. 12C) muestra que las bacterias fecales de WT y TLR7Tg se agrupan de forma significativamente diferente (Fig. 12D).

Para completar el análisis de la microbiota, se llevó a cabo un análisis LEfSe para encontrar las especies con una asociación más fuerte con el fenotipo desarrollado por la sobreexpresión de TLR7. Entre los taxones con mayores diferencias de abundancia entre ambos genotipos, las especies *Bacteroides acidifaciens*, *Desulfovibrio c20_c21* y el género *Ruminococcus* aparecieron como colonizadoras del intestino de los ratones TLR7Tg, pero no de los WT (Fig. 12E). Por otro lado, taxones del orden *Clostridiales* y del género *Oscillospira* y *Clostridium*, así como de la familia *Coriobacteriaceae* se encontraron asociadas a la microbiota de ratones WT, y no de los TLR7Tg (Fig. 12E). En estas diferencias, *Bacteroides acidifaciens* fue la que presentó el tamaño de efecto con mayor valor absoluto, abundancia que fue confirmada mediante un análisis de

composición de microbiomas (ANCOM, del inglés *Analysis of compositions of microbiomes*) (Fig. 12F) y la representación de las frecuencias relativas encontradas en las muestras (Fig. 12G).

Los resultados pertinentes a la composición de la microbiota reflejan que la sobreexpresión transgénica de TLR7 induce un cambio en la composición microbiana intestinal global, permitiendo la proliferación de especies diferentes a las de la microbiota de ratones WT.

1.4. La disrupción de la barrera intestinal en los ratones TLR7Tg modula la respuesta sistémica frente a los comensales.

1.4.1. La respuesta en suero de los ratones TLR7Tg es diferente frente a comensales autólogos y heterólogos.

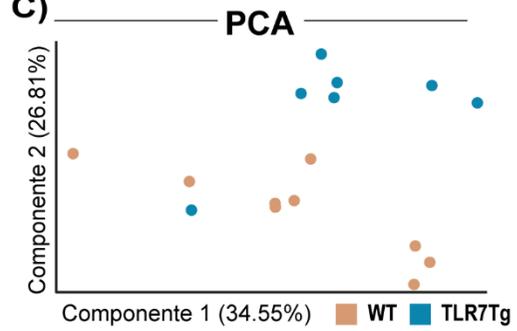
Cuando la barrera epitelial pierde su integridad, desaparece la regulación del paso de bacterias desde el tracto intestinal al GALT y a otros órganos linfoides. En estas condiciones pueden darse fenómenos de translocación bacteriana a los mLN o el hígado, un proceso que se ha visto capaz de inducir una respuesta humoral tanto a nivel intestinal como sistémico frente a las bacterias intestinales³²⁹.

Con esta premisa, se procedió a la caracterización de la respuesta IgM, IgG2c e IgA en suero ante las bacterias fecales asociadas con uno y otro genotipo mediante ELISAs autólogos y heterólogos desarrollados por nuestro grupo (Fig. 13A). Los niveles de IgM en suero con reactividad a las bacterias fecales fueron significativamente menores en los ratones TLR7Tg independientemente del donador de bacterias (Fig. 13B, primera fila), mientras que la respuesta IgA sistémica frente a la microbiota intestinal fue comparable para ambos genotipos en los experimentos autólogos y heterólogos (Fig. 13B, segunda fila).

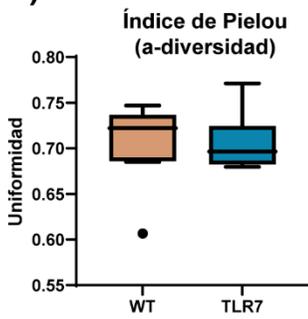
A)

Índice	p valor
Distancia filogenética de Faith	0.6338
Uniformidad	0.5604

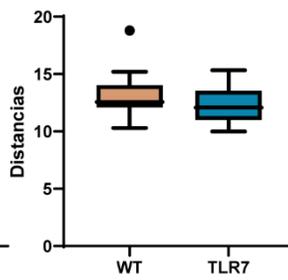
C)



B)

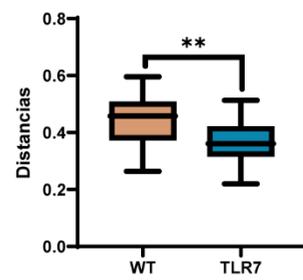


Distancias filogenéticas

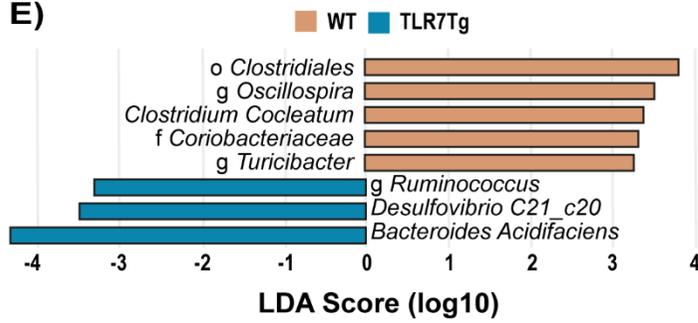


D)

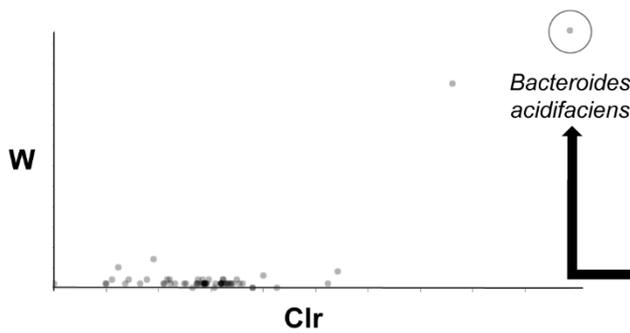
β-diversidad (distancias a TLR7Tg)



E)



F)



G)

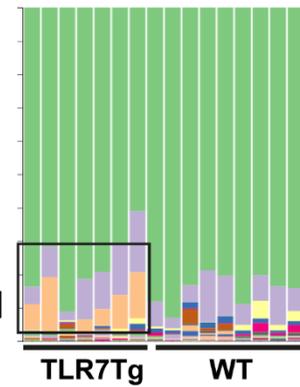
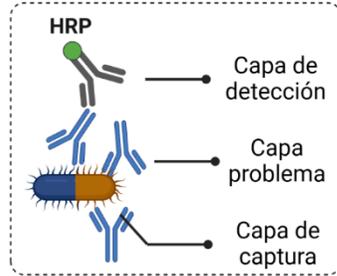
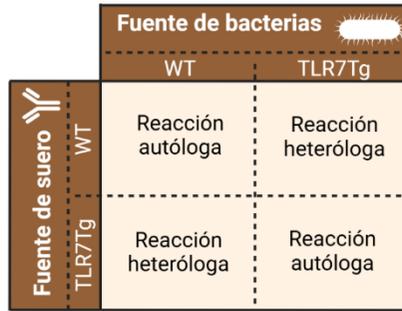


Figura 12. Los ratones TLR7Tg presentan disbiosis intestinal. A-B) Representación de la alfa diversidad (distancia filogenética de Faith e índice de Pielou o Uniformidad) entre ratones WT y TLR7Tg. Valor de p de la comparación estadística de las distancias filogenéticas de Faith y de la Uniformidad entre ratones WT y TLR7Tg. C-D) Representación de la beta diversidad entre ratones WT y TLR7Tg. C) Representación del Análisis por Componentes Principales y D) comparativas par a par mediante PERMANOVA. E) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de los ecosistemas bacterianos intestinales. F) Análisis de composición de microbiomas (ANCOM). G) Gráficos de barras con la abundancia relativa de las especies encontradas en ratones WT y TLR7Tg. Cada columna representa una muestra original. Las barras de color naranja presentes de forma diferencial en los ratones TLR7Tg corresponden con *Bacteroides acidifaciens*. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=6-12 ratones por grupo. B,D) Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. **p≤0.01; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

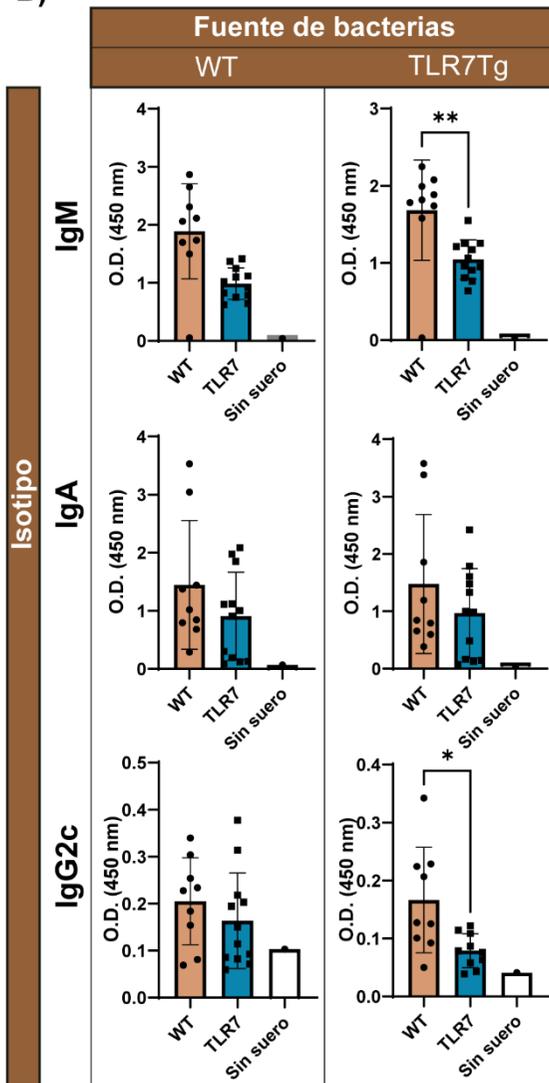
La medición de la respuesta IgG2c contra los comensales de ratones WT fue similar en el suero de los ratones WT o TLR7Tg, pero sí se encontraron diferencias significativas entre los sueros de ambos genotipos cuando la fuente de bacterias era un ratón TLR7Tg (Fig. 13B, tercera fila). En ese supuesto, los TLR7Tg presentaron en suero niveles significativamente menores de IgG2c circulante con reactividad para bacterias autólogas, en comparación con el suero de ratones WT frente a bacterias procedentes de ratones TLR7Tg (Fig. 13B, tercera fila).

A la luz de los diferentes niveles de unión de IgG2c sistémica encontrados en los ratones TLR7Tg en función de la fuente de los comensales bacterianos, se continuó con el análisis de la respuesta autóloga de anticuerpos en suero frente a bacterias intestinales por citometría de flujo (Fig. 13C). Estos resultados confirmaron la significativamente menor presencia de IgM circulantes con reactividad para las bacterias intestinales en el suero de los ratones TLR7Tg con respecto a los ratones WT, (Fig. 13D), mientras que ambos genotipos presentaban niveles séricos comparables de IgG2c frente a su propia microbiota (Fig. 13D). Hasta el momento, los análisis relativos a la reactividad de las inmunoglobulinas séricas frente a la microbiota intestinal muestran que el desarrollo de lupus mediado por la sobreexpresión de TLR7 induce un cambio en la respuesta humoral sistémica.

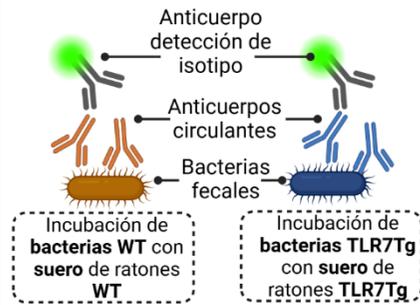
A) Esquema de ELISAs autólogas y heterólogas



B)



C) Esquema de incubaciones autólogas



D)

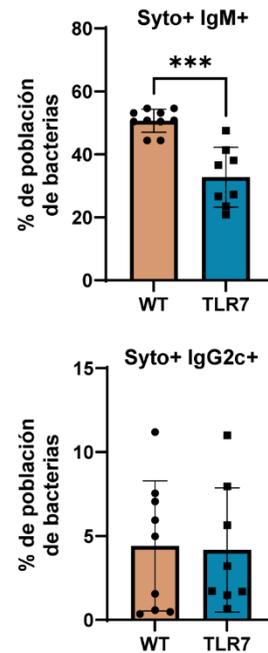


Figura 13. El modelo TLR7Tg induce cambios en la respuesta inmunitaria humoral contra bacterias fecales autólogas y heterólogas. A) Ilustración de los experimentos realizados para determinar la respuesta humoral sistémica contra las bacterias fecales de forma autóloga y heteróloga por ELISA. B) Medida por ELISA de la respuesta IgM (arriba), IgA (centro) e IgG2c (abajo) en suero frente a bacterias fecales de ratones WT (columna izquierda) o TLR7Tg (derecha). C) Representación del análisis de la respuesta sistémica autóloga contra bacterias fecales por citometría de flujo. D) Frecuencia de bacterias fecales reconocidas por IgM (arriba) o IgG2c (abajo) circulantes de WT o TLR7Tg. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=8-12 ratones por grupo. B,D) Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 32 semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

1.4.2. La sobreexpresión de TLR7 induce una respuesta sistémica contra *B. acidifaciens*.

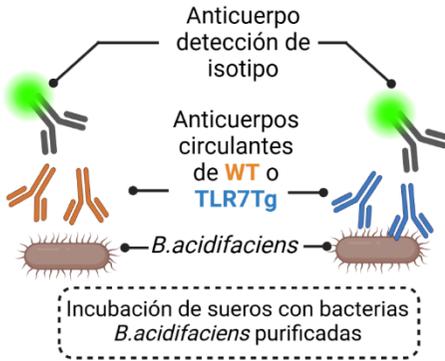
La caracterización de la composición de la microbiota apuntó a *B. acidifaciens* como una de las especies con las diferencias más notables entre ambas especies, con una sobreabundancia notable en ratones TLR7Tg (Fig. 12E,F). Teniendo en cuenta la disrupción en la permeabilidad intestinal observada en estos ratones (Fig. 10A-D), se analizó a continuación la respuesta de anticuerpos en suero frente a *B. acidifaciens* en ratones WT y TLR7Tg de 30-32 semanas de edad mediante citometría de flujo (Fig. 14A). La frecuencia de bacterias de *B. acidifaciens* cubierta por anticuerpos séricos fue significativamente mayor en el caso de TLR7Tg respecto de los controles WT para todos los isotipos analizados (IgA, IgG2c e IgM) (Fig. 14B). En este contexto, además, resultó especialmente llamativo que, mientras que el porcentaje de bacterias recubiertas por IgA e IgG2c no superaba el 30% en WT ni en TLR7Tg, estas frecuencias se incrementan hasta un rango de, al menos, el 80% en el caso de anticuerpos IgM (Fig. 14B). El análisis de MFI presentó un comportamiento similar (Fig. 14C).

Debido a que *B. acidifaciens* no fue identificada como una especie colonizadora del intestino de los ratones WT, se hipotetizó que los altos porcentajes de unión de IgM sérica en ratones WT frente a esta bacteria podrían ser consecuencia de una respuesta

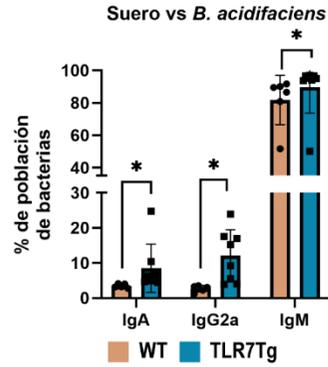
policlonal. Para determinar la especificidad de estos anticuerpos, se realizó un ensayo de titulación de sueros frente a *B. acidifaciens* o frente a una bacteria no relacionada y ausente en la microbiota de ambos tipos de ratones (*Parabacteroides distasonis*), a modo de control negativo. Para cada dilución de suero, se midió la unión de IgM por citometría de flujo, se calculó la MFI y se determinó el área bajo la curva (AUC) para cada genotipo con cada una de las bacterias, siguiendo la metodología descrita por Danska et al³¹⁵. La premisa basal de este experimento reside en las dinámicas de afinidad de las inmunoglobulinas. Si los anticuerpos séricos son específicos de *B. acidifaciens*, se espera una disminución progresiva de la señal con las diluciones, generando un mayor valor de AUC; si, por el contrario, los anticuerpos son policlonales y, en consecuencia, no presentan especificidad por un antígeno concreto de *B. acidifaciens*, la señal será similar y constante, lo que resultaría en un menor AUC. Este experimento permite así de forma indirecta la afinidad y especificidad de los anticuerpos por su diana (Fig. 14D). La titulación e incubación del suero de ratones TLR7Tg frente a *B. acidifaciens* generó valores de AUC significativamente mayores que el suero de ratones WT, mientras que ambos genotipos mostraron valores similares y con un valor significativamente inferior cuando se enfrentaron a *P. distasonis* (Fig. 14E, 14F). Estos resultados indican que el incremento en el pegado de IgM reconoce de forma específica a *B. acidifaciens*.

De forma paralela a la respuesta sistémica específica frente a *B. acidifaciens*, se observó en los ratones TLR7Tg un incremento significativo de las concentraciones séricas totales de IgA, IgG2c e IgM (Fig. 15A), pero solo los niveles de IgM mostraron una correlación directa y significativa con la cantidad de IgM en suero que reconoce a *B. acidifaciens* (Fig. 15B). Esta correlación no se observó para la IgM sérica en los ratones WT (Fig. 15C). Adicionalmente, se encontró también una correlación significativa entre los niveles de IgM en suero con reactividad para *B. acidifaciens* y los

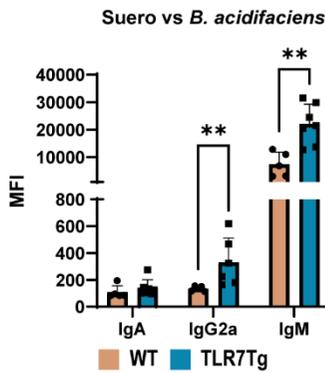
A) Análisis de la respuesta sistémica frente a *B. acidifaciens*



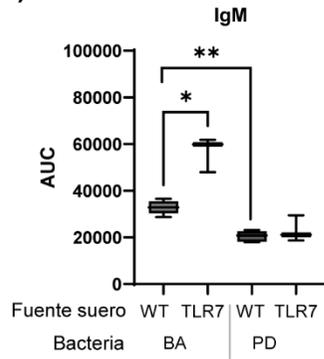
B)



C)

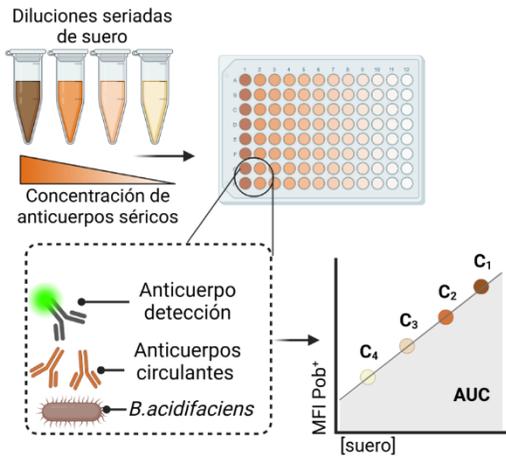


F)



D)

Análisis de la especificidad antigénica



E)

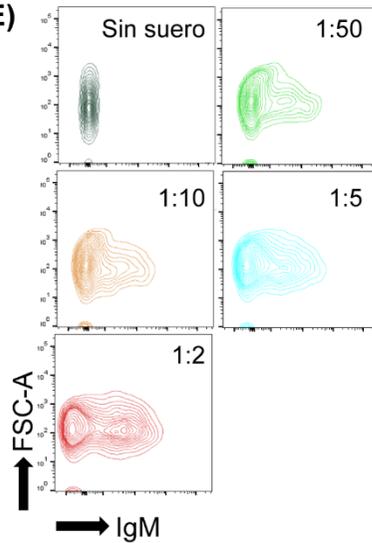


Figura 14. Los ratones TLR7Tg presentan una respuesta sistémica específica de *B. acidifaciens*. A) Ilustración de los experimentos realizados para determinar la respuesta humoral sistémica contra *B. acidifaciens* por citometría de flujo. B-C) Frecuencia (B) y valor medio de la intensidad de la señal (MFI) (C) de bacterias *B. acidifaciens* fecales reconocidas por IgA, IgG2a o IgM circulantes de WT o TLR7Tg caracterizado por citometría de flujo. D) Representación de la metodología de trabajo diseñada para la medición del área bajo la curva (AUC). E) Plots representativos del pegado de IgM hacia *B. acidifaciens* en diluciones desde 1:2 hasta 1:50 de suero de ratones TLR7Tg. F) AUC generada por la incubación de sueros de ratones WT y TLR7Tg con *B. acidifaciens* (BA, primera mitad de la gráfica) o con *P. distasonis* (PD, segunda mitad de la gráfica). B,C,F) Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=5-7 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 32 semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. *p≤0.05; **p≤0.01; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

autoanticuerpos antinucleares de isotipo IgM circulantes, solo en el caso de los ratones TLR7Tg (Fig. 7D). Para evaluar la posible reactividad cruzada entre la IgM del suero de los ratones TLR7Tg entre *B. acidifaciens* y el ADNdc, se llevó a cabo un ensayo de inhibición. En él, el suero se incubó secuencialmente con diferentes concentraciones de *B. acidifaciens* y, posteriormente, con ADNdc y se cuantificó la cantidad de IgM unida. La pre-incubación del suero con las bacterias purificadas inhibió la unión de los anticuerpos de isotipo IgM al ADNdc (Fig. 15E). En conjunto, la caracterización de la respuesta sistémica de los ratones TLR7Tg frente a *B. acidifaciens* indica una posible translocación de este taxón y el desarrollo de una reacción cruzada antigénica con el ADNdc, especialmente para el isotipo IgM.

2. La ausencia del gen *Bank1* modula la respuesta inmunitaria intestinal y sistémica en ratones control y con lupus.

El gen *Bank1* se ha asociado con el desarrollo del lupus en cohortes independientes de pacientes de lupus y su ausencia se ha relacionado con una mejora en modelos murinos espontáneos ¹⁴⁹.

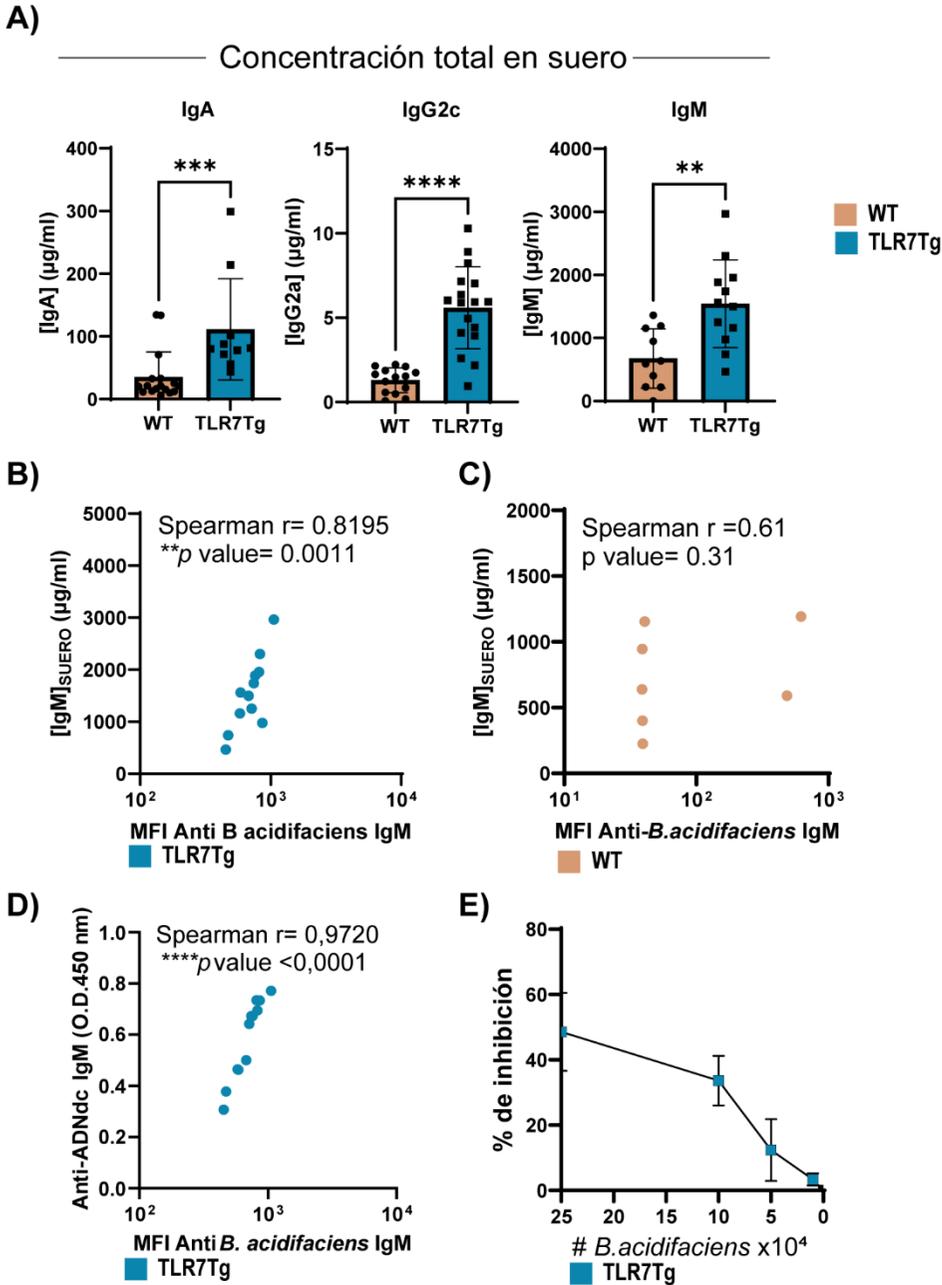


Figura 15. Los autoanticuerpos nucleares IgM presentan reactividad cruzada con *B. acidifaciens*. A) Concentraciones totales en suero de IgA, IgG2c e IgM en ratones WT y TLR7Tg medidos por ELISA. B-C) Correlación entre los niveles séricos totales de IgM y la respuesta sérica IgM específica de *B. acidifaciens* medida por citometría de flujo en ratones TLR7Tg (B) y WT (C). D) Correlación entre los niveles séricos de IgM con reactividad al ADNdc y a *B. acidifaciens*. E) Ensayo de inhibición del pegado de IgM sérica hacia el ADNdc mediante pre-incubación con *B.acidifaciens*. En el eje y se muestra el porcentaje de inhibición medido sobre la señal máxima obtenida por ELISA. A-E) Los datos son representativos de dos experimentos independientes con

n=7-18 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 32 semanas de edad. A: Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. B-D: Test estadístico de correlación de Spearman (r) . * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

Con el objetivo de analizar el papel de la señalización de *Bank1* en las células B intestinales en condiciones basales y tras el desarrollo del lupus en modelos murinos, se usaron ratones genéticamente modificados para eliminar dicho gen del genoma de ratones C57BL/6 o TLR7Tg.

2.1. La eliminación de *Bank1* modifica la respuesta inmunitaria intestinal en condiciones basales

Al evaluar el impacto de la ausencia de *Bank1* en la respuesta inmunitaria del GALT se encontró por citometría de flujo y microscopía confocal un número significativamente menor de células B en las PP y SILP de ratones *Bank1*^{-/-} (B1KO) en comparación con sus controles WT (Fig 16A, B). En los mLN, sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles totales de células B (Fig. 16C). Además, los ratones B1KO presentaron una acumulación significativa de células B en sangre periférica (Fig. 16D). El inmunofenotipado de las células B presentes en el intestino de ambos grupos mostró que la mayoría de ellas (71% \pm 3.7% en las PP y 68.2% \pm 13.5% en la SILP) eran dobles positivas para IgM e IgD (Fig. 16E), indicando la ausencia de diferencias en el grado de activación de las células B intestinales.

Para investigar la disminución de células B en el GALT y su aparente retención en sangre periférica en los ratones B1KO, se midió la expresión de la integrina $\alpha_4\beta_7$, la cual está implicada en la migración de las células B al intestino²⁴⁰. La expresión de dicha integrina se midió por citometría de flujo en células B intestinales.

La ausencia del gen Bank1 modula la respuesta inmunitaria intestinal y sistémica en ratones control y con lupus.

En las PP, SILP y mLN se encontraron frecuencias significativamente mayores de células B $\alpha_4\beta_7^+$ en ratones B1KO, mientras que los niveles de expresión de la integrina fueron similares entre los dos genotipos en las células B de sangre periférica (Fig. 16F).

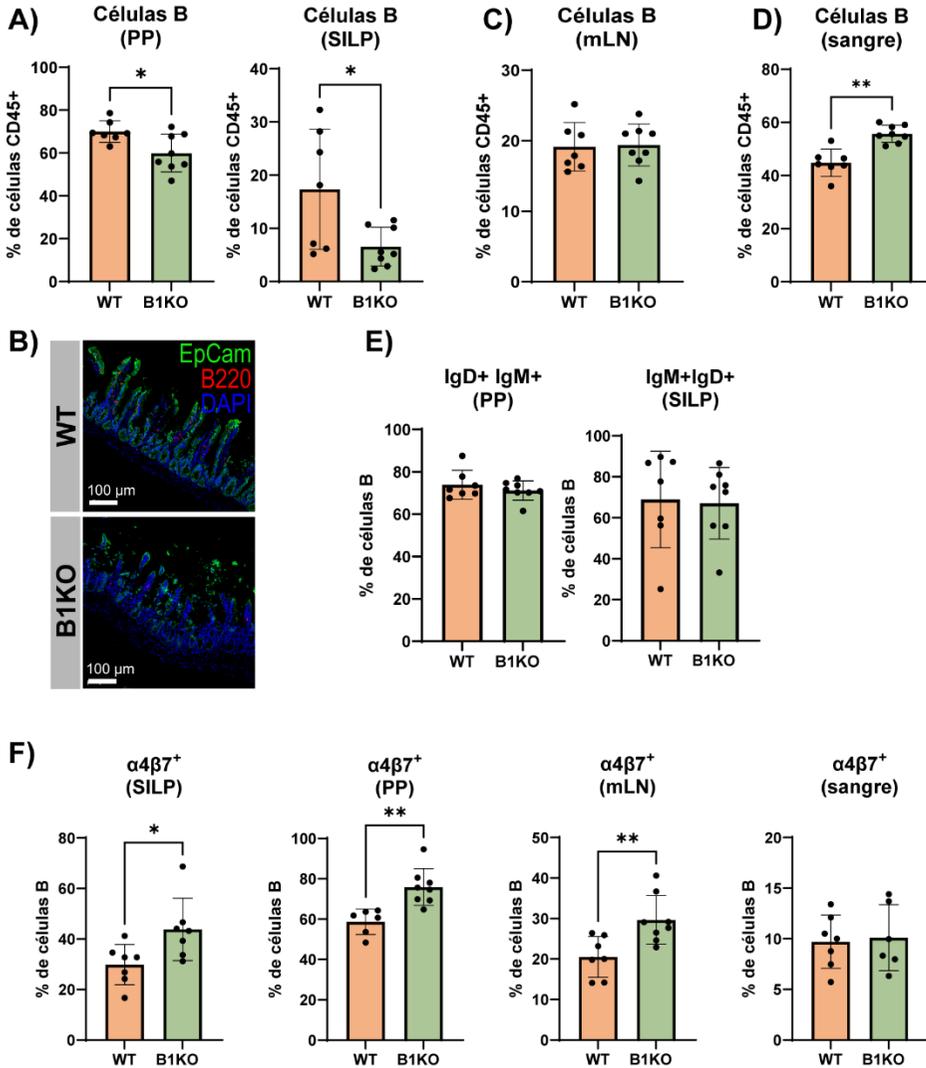


Figura 16. La ausencia de Bank1 induce una disminución en el número de células B en el intestino en estado basal. A-D) Análisis de células B (caracterizadas como CD19+ B220+) en el tejido inmunitario intestinal: PP y SILP (A,B), mLN (C) y sangre (D) caracterizadas por citometría de flujo (A, C, D) y por microscopía confocal (B). B) Tinción de células B en cortes longitudinales de íleon de ratones WT y B1KO. Células B: B220+ (rojo), células intestinales: EpCam+ (verde). Imagen representativa (WT n=7; B1KO n=8) E) Frecuencia de células B $IgD^+ IgM^+$ en PP y SILP medida por citometría de flujo. F) Análisis de la expresión de la integrina $\alpha_4\beta_7$ en SILP, PP, mLN y sangre por citometría de flujo de ratones WT y B1KO. PP: placas de Peyer, SILP: Lámina

propia del intestino delgado, mLN: ganglios linfáticos mesentéricos. A,C-F) Los datos son representativos de, al menos, tres experimentos independientes con $n=7-9$ ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 semanas de edad. Las imágenes en B) fueron capturadas usando el objetivo ZEISS Axiocam 506 mono 10X/0.45. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. $*p\leq 0.05$; $**p\leq 0.01$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

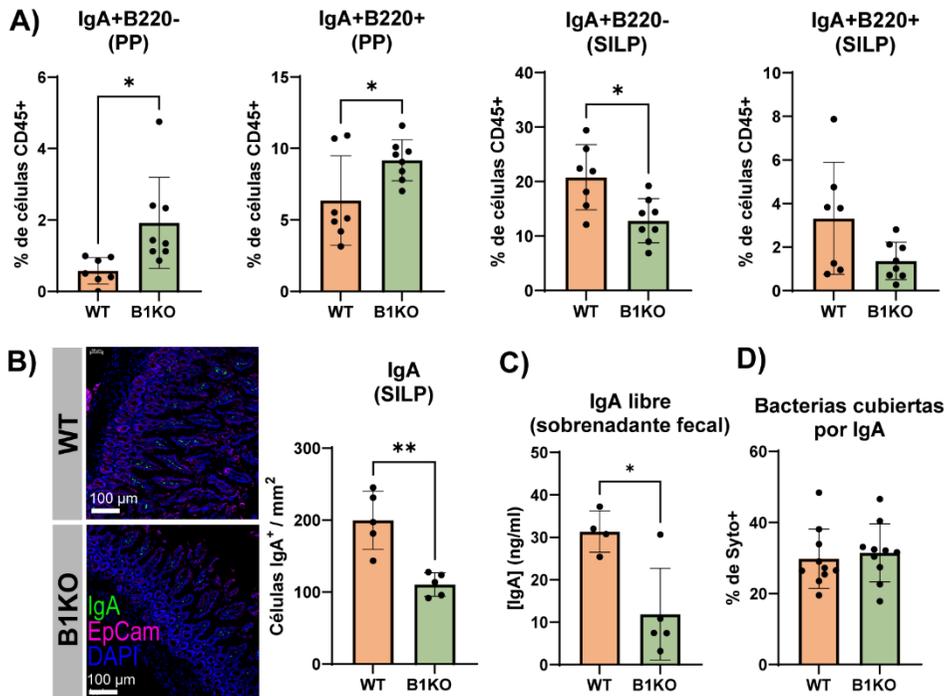


Figura 17. La ausencia de *Bank1* modifica la respuesta inmunitaria intestinal en estado basal. A) Frecuencia de células B productoras de IgA B220- y B220+ en PP y SILP de ratones WT y B1KO. B) Patrón de tinción de células IgA+ en cortes longitudinales de íleon de ratones WT y B1KO por microscopía confocal y cuantificación. Células IgA+ (verde), células intestinales: EpCam+ (rosa). Imagen representativa (WT $n=7$; B1KO $n=8$) C, D) Análisis de la respuesta IgA intestinal mediante la cuantificación de la IgA libre en sobrenadantes fecales por ELISA (C) y el pegado de IgA hacia las bacterias fecales por citometría de flujo (D). PP: placas de Peyer, SILP: Lámina propia del intestino delgado. A-D) Los datos son representativos de tres experimentos independientes con $n=7-9$ ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 semanas de edad. Las imágenes en B) fueron capturadas usando el objetivo ZEISS Axiocam 506 mono. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. $*p\leq 0.05$; $**p\leq 0.01$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

La ausencia del gen *Bank1* modula la respuesta inmunitaria intestinal y sistémica en ratones control y con lupus.

Posteriormente, se procedió a evaluar los efectos de los cambios en la frecuencia de células B en la respuesta humoral intestinal, para lo que se caracterizaron por citometría de flujo y microscopía confocal los niveles de células B220⁺ IgA⁺ y B220⁻ IgA⁺. Los ratones B1KO presentaron en las PP niveles significativamente mayores de ambos subtipos celulares, mientras que presentaron frecuencias menores en la SILP, en comparación con sus controles WT (Fig. 17A, B).

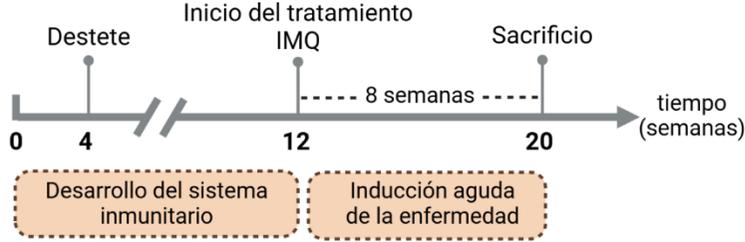
Estos cambios a nivel celular fueron evaluados a nivel funcional mediante la medida de la IgA libre en la materia fecal y el porcentaje de bacterias fecales cubiertas por dicha inmunoglobulina. En este análisis se vio una disminución significativa de IgA secretada a la luz intestinal en los ratones deficientes para *Bank1* respecto a los ratones WT (Fig. 17C), pero no se encontraron diferencias en los niveles de IgA unida a las bacterias fecales en ambos genotipos (Fig. 17D).

De forma conjunta, los análisis de la respuesta inmunitaria intestinal en ratones B1KO permitieron establecer la influencia de la señalización por *Bank1* en condiciones basales, sugiriendo un papel modulador de la respuesta inmunitaria celular y humoral en el intestino.

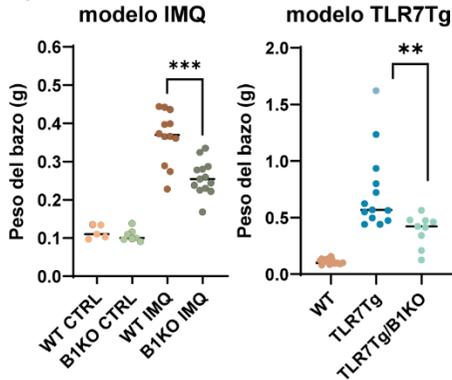
2.2. Los ratones deficientes para *Bank1* desarrollan lupus con una menor severidad.

La contribución del gen *Bank1* en el desarrollo del lupus se evaluó mediante el uso de dos modelos de lupus dependientes de TLR7, uno de ellos inducible, mediado por la administración del agonista de TLR7 Imiquimod (IMQ) y otro de ellos crónico, utilizando el modelo espontáneo de lupus TLR7Tg (Figura 18A, 1A).

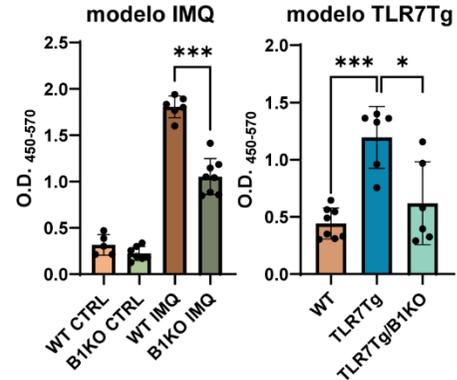
A) — Cinética de desarrollo de lupus en el modelo IMQ —



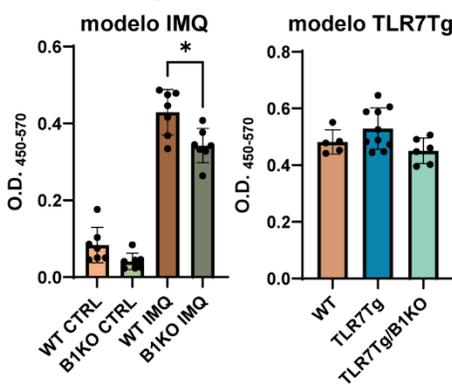
B) — Esplenomegalia —



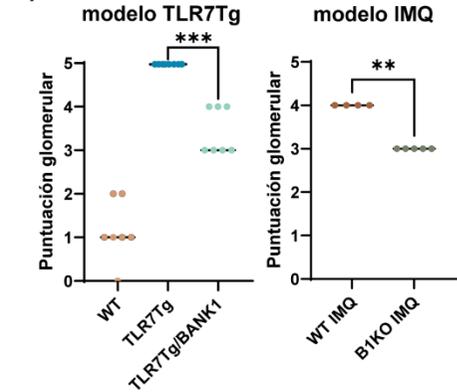
C) — IgG2c anti-ADNdc —



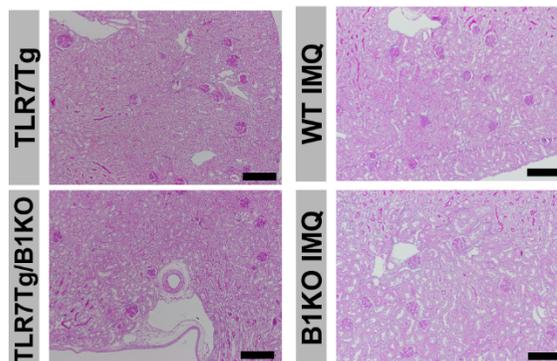
D) — IgG total anti-ADNdc —



E) — Daño renal —



F)



La ausencia del gen *Bank1* modula la respuesta inmunitaria intestinal y sistémica en ratones control y con lupus.

Figura 18. Los ratones B1KO presentan menor severidad en el fenotipo de lupus.

A) Descripción temporal del modelo de inducción de lupus por aplicación tópica de IMQ. B) Caracterización de la esplenomegalia en ratones con lupus en el modelo agudo (IMQ) y espontáneo (TLR7Tg) caracterizada por la masa del bazo. C-D) Niveles de autoanticuerpos de isotipo (C) IgG2c e (D) IgG total anti-ADNdc en suero medidos por ELISA. E) Estudio del daño renal mediante un sistema de puntuación glomerular basado en el análisis ciego de las micrografías ópticas renales (0: ningún nivel de daño, 5: daño renal elevado). F) Micrografías representativas de cortes de riñón teñidos con la tinción PAS para ratones *Bank1*^{+/+} y *Bank1*^{-/-} en el modelo agudo y espontáneo. La escala en las fotos representa 20 μm . B-E) Datos de, al menos, 5 experimentos independientes con n=7-9 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 (modelo IMQ) y 32 (modelo TLR7Tg) semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

2.2.1. Caracterización de las manifestaciones sistémicas e intestinales

En ambos modelos, la eliminación de *Bank1* del genoma resultó de forma consistente en una reducción de la esplenomegalia y los niveles de autoanticuerpos anti-ADNdc de isotipo IgG2c en comparación con sus controles *Bank1*^{+/+} (Fig. 18B, C). Sin embargo, los niveles de IgG total con reactividad hacia el ADNdc solo se redujeron significativamente en los ratones B1KO tratados con IMQ, mientras que, en el modelo crónico, los ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO presentaron niveles comparables de estos autoanticuerpos (Fig. 18D). La evaluación del daño renal, otro de los síntomas característicos del LES en humanos, mostró también una mejora en las afecciones en ausencia de *Bank1* en ambos modelos (Fig. 18E, F).

La señalización por TLR7 se ha relacionado en pacientes de LES con la formación espontánea de CG y una mayor tasa de activación de células B autorreactivas³³⁰. Este hecho, junto con la observación de una notable inflamación en el intestino desarrollada por los ratones tras la inducción con IMQ o el desarrollo espontáneo del lupus, llevaron a evaluar la respuesta de los CGs en las PP intestinales. En consonancia con la inflamación sistémica más leve observada en los ratones B1KO tratados con IMQ, se encontró en ellos una menor frecuencia de células B de CG en comparación con sus homólogos WT tratados con IMQ (Fig. 19A). En el modelo TLR7Tg, los

ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO presentaron niveles incrementados de células B de GC en comparación con sus controles sanos WT, y, aunque en ratones TLR7Tg/B1KO, la frecuencia de células B de CG también se redujo respecto a los ratones TLR7Tg, esta disminución no alcanzó la significación estadística (Fig. 19B).

Estos resultados muestran, de forma conjunta, que las manifestaciones intestinales del lupus ocurren de manera consistente y paralela con las sistémicas.

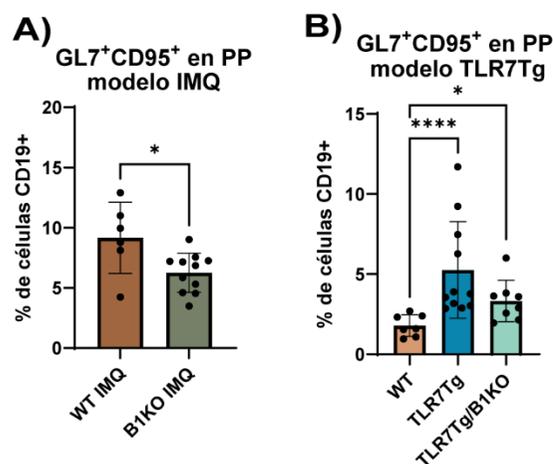


Figura 19. Los ratones *Bank1*^{-/-} presentan una menor formación de centros germinales intestinales. A-B) Representación de la frecuencia de células B de centro germinal (GL7+ CD95+) en las placas de Peyer de ratones del modelo agudo (WT n=6; B1KO n=11) (A) y espontáneo (WT n=7; TLR7Tg n=11; TLR7Tg/B1KO n=8) (B). Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes con n=6-11 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 (modelo IMQ) y 32 (modelo TLR7Tg) semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. *p≤0.05; ****p≤0.0001; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

2.2.2. Evaluación del estado de la barrera intestinal epitelial.

Para abordar si la ausencia de *Bank1* podría estar teniendo algún efecto en la permeabilidad intestinal, se evaluó esta característica mediante el uso de FITC-dextrano como se ha descrito en secciones previas. Los ratones B1KO tratados con IMQ presentaron una menor permeabilidad intestinal determinada por una menor intensidad de la señal de FITC en suero en comparación con los ratones WT tratados

con IMQ (Fig. 20A). De forma similar, los ratones TLR7Tg/B1KO presentaron una marcada disminución en su permeabilidad intestinal en relación con los ratones TLR7Tg, alcanzando niveles comparables a los controles WT de la misma edad sin lupus (Fig. 20B).

Estas alteraciones observadas en la función barrera tras la inducción y el desarrollo del lupus en ambos modelos se tradujeron en cambios en el patrón de distribución de la claudina-1 en el epitelio ileal. En ratones TLR7Tg y en ratones WT tratados con IMQ, esta proteína se encontró mayormente en el citoplasma de los enterocitos en forma de agregados intracelulares, indicando alteraciones en las uniones celulares TJ. La ausencia de *Bank1* se tradujo en ambos modelos en la restauración de la distribución normal de esta proteína, en la membrana celular, de forma comparable a lo observado en los controles sin lupus (Fig. 20C).

Las alteraciones en la barrera intestinal pueden permitir el paso de bacterias hacia localizaciones extraintestinales³³¹. Dado que el modelo espontáneo mostró los cambios más llamativos en la permeabilidad intestinal, se eligió este grupo de animales para evaluar la translocación de bacterias comensales mediante el cultivo de los mLN. El estudio de la microbiota por secuenciación de ARNr 16S (V4) y por LEfSe de las especies presentes en mLN de ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO ilustró que, en ausencia de *Bank1*, existe una translocación diferencial de bacterias intestinales (Fig. 20D). Los géneros *RFN20*, *Rickettsia* y las especies *Stenotrophomonas genic* y *Lactobacillus salivarius* se encontraron de forma diferencial en los mLN de ratones TLR7Tg, mientras que la familia *Enterobacteriaceae* apareció como translocada solo en los mLN de ratones TLR7Tg/B1KO (Fig. 20D).

De forma global, estos resultados indican que la eliminación de la señalización mediada por *Bank1* induce una mejora en las manifestaciones del lupus mediado por TLR7.

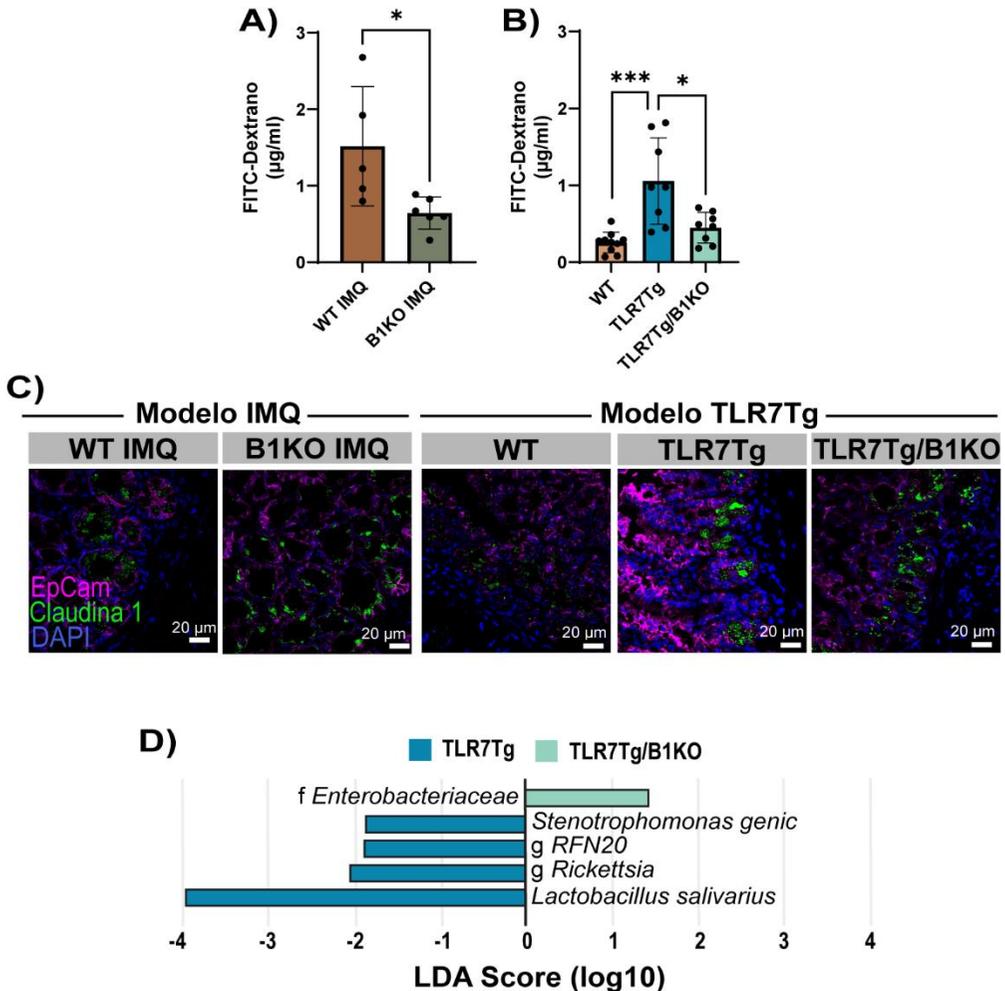


Figura 20. La ausencia de *Bank1*^{-/-} induce en los ratones con lupus una menor permeabilidad intestinal y translocación bacteriana diferencial. A-B) Cuantificación *in vivo* de la permeabilidad intestinal en el modelo agudo (A) y espontáneo (B). Datos representativos de tres experimentos independientes con n=5-10 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD. C) Tinción representativa de la expresión de claudina-1 en cortes transversales del íleon distal por microscopía confocal. Todas las imágenes fueron capturadas usando un objetivo Zeiss Plan-Apochromat 63X/1.40 NA en aceite de inmersión DIC M27 (apertura de *pinhole*= 1.0 AU). D) Análisis LefSe de las especies encontradas en mLN de ratones TLR7Tg o TLR7Tg/B1KO. N=3-10 ratones para cada genotipo. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

2.3. *Bank1* regula la respuesta inmunitaria celular y humoral en el intestino de ratones con lupus.

En condiciones basales, la ausencia de *Bank1* indujo en los ratones una disminución significativa de células B totales en el intestino, una acumulación de las células B IgA⁺ en las PP y una disminución notable de la IgA secretada al lumen (Fig. 8A, 8B, 9A-9C). Tras la inducción de lupus, se analizó la respuesta celular y humoral intestinal de la misma forma en ratones tratados con IMQ.

En las PP y SILP, la frecuencia de células B totales alcanzó en ratones B1KO niveles similares a los encontrados en sus homólogos WT tratados con IMQ (Fig. 21A, B), pero se dio una acumulación de estas células en sangre (Fig. 21C) y mLN (Fig. 21D). Con la nivelación de la frecuencia de células B totales al intestino se igualó también la frecuencia de las células IgA⁺ B220⁻ en las PP y SILP entre ratones B1KO y WT tratados con IMQ (Fig. 21E).

En relación a la respuesta humoral intestinal, los cambios descritos en las células plasmáticas productoras de IgA tras la inducción de lupus se tradujeron en niveles semejantes de la concentración de la forma libre de esta inmunoglobulina en ambos genotipos (Fig. 21F). Por su parte, en la cobertura de las bacterias fecales por IgA se encontró un leve incremento que no alcanzó la significación estadística en ratones B1KO tratados con IMQ al compararlos con el grupo de WT tratados con IMQ (Fig. 21G). Finalmente, en el modelo espontáneo se encontró que la eliminación de *Bank1* indujo en los ratones con lupus una disminución significativa de la IgA libre hasta alcanzar los niveles encontrados en los ratones sanos (WT) (Fig.21H), pero no alteró el nivel del pegado de IgA a las bacterias fecales (Fig. 21I).

Los resultados obtenidos por el análisis de la respuesta celular y humoral del intestino indican que *Bank1* es necesario para la inducción de una respuesta IgA adecuada en las mucosas.

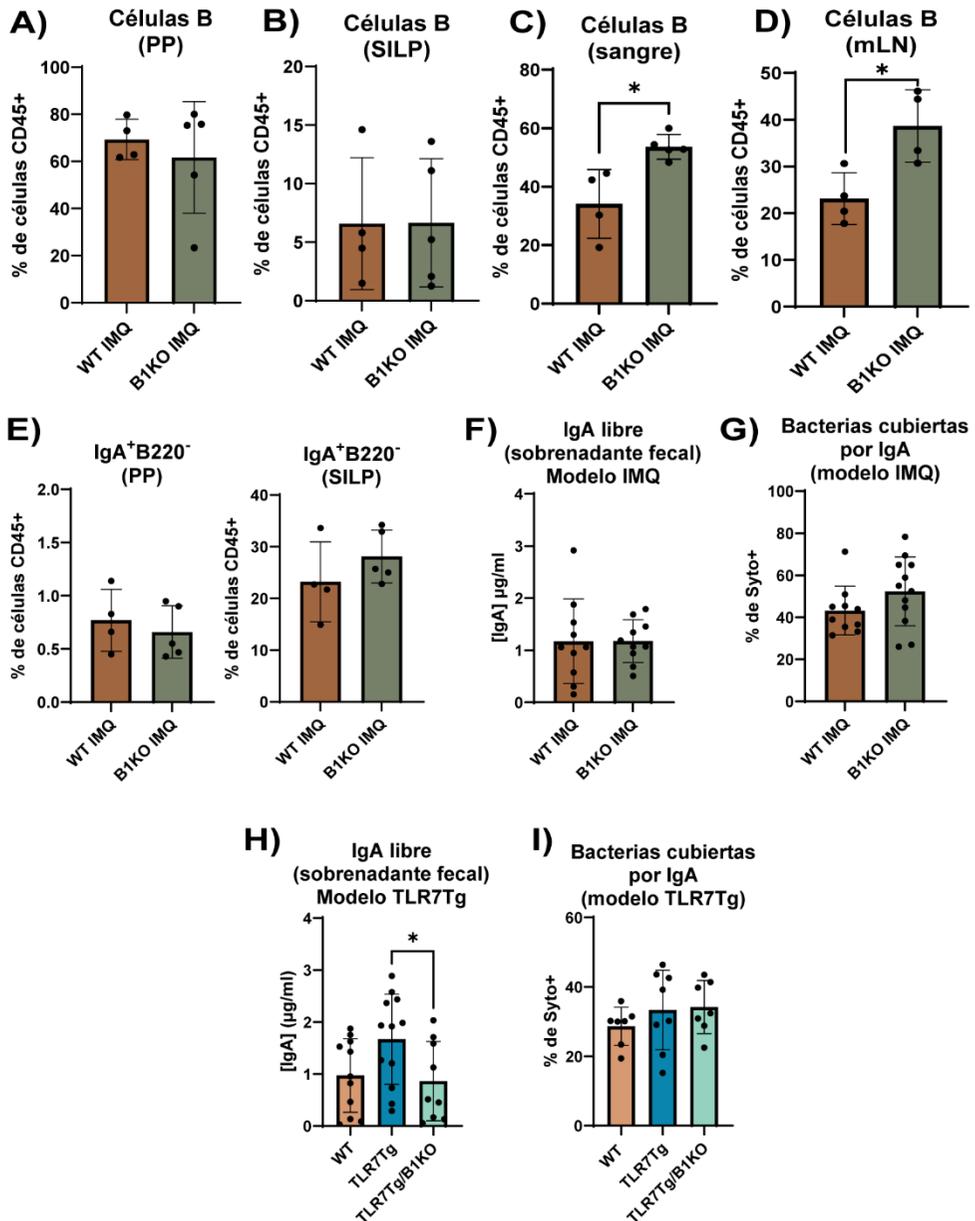


Figura 21. *Bank1* regula la respuesta inmunitaria celular y humoral en el intestino en ratones con lupus. A-D) Caracterización de células B (caracterizadas como CD19⁺ B220⁺) tras la inducción de lupus (WT n=4; B1KO n=5) en PP (A), SILP (B), mLN (C) y sangre (D) por citometría de flujo. E) Frecuencia de células B productoras de IgA B220⁻ en PP y SILP de ratones WT y B1KO tratados con IMQ (WT n=4; B1KO n=5). F-I) Análisis de la respuesta IgA intestinal mediante la cuantificación de la IgA libre en sobrenadantes fecales por ELISA (F, H) y el pegado de IgA hacia las bacterias fecales por citometría de flujo (G, I) en ratones tratados con IMQ (F, G) (WT

La señalización por Bank1 regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

n=10; B1KO n=12) o del modelo espontáneo (H,I) (WT n=11; TLR7Tg n=12; TLR7Tg/B1KO n=8). PP: placas de Peyer, SILP: Lámina propia del intestino delgado, mLN: ganglios linfáticos mesentéricos. A-I) Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 (modelo IMQ) o 32 (modelo TLR7Tg) semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

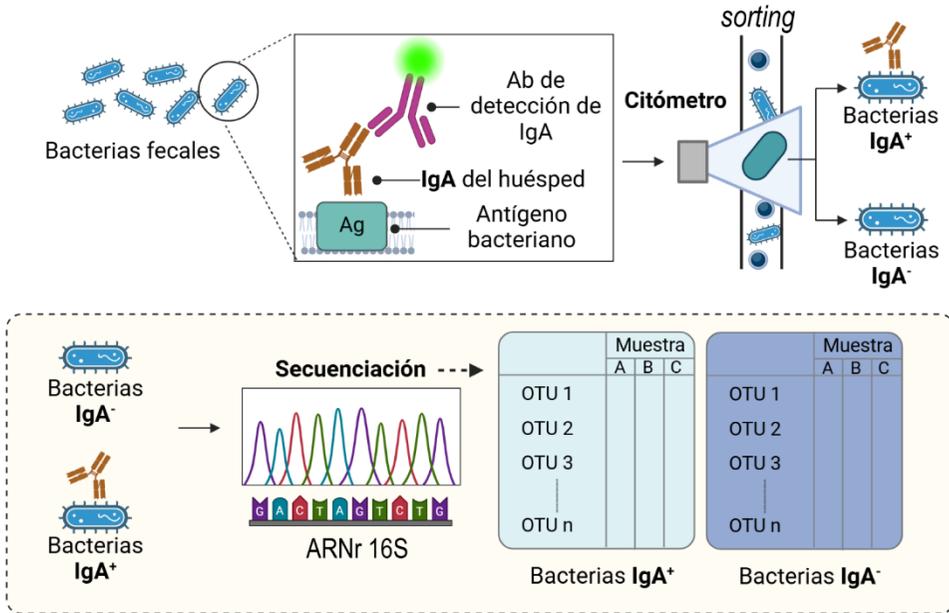
3. La señalización por Bank1 regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

Los resultados descritos hasta el momento exponen que la eliminación del gen *Bank1* modula la respuesta inmunitaria intestinal a nivel de las células B y la consecuente respuesta IgA asociada, tanto en condiciones basales como tras la inducción y el desarrollo de lupus. Dado que la respuesta IgA ejerce un papel activo sobre la composición de la microbiota^{326,332}, se analizó a continuación la composición de la microbiota asociada a una respuesta IgA y la composición bacteriana general mediante el análisis multiparamétrico a nivel de célula única (*single cell*) y la secuenciación del ARNr 16S (V4). De forma adicional, el análisis multiparamétrico a nivel de célula única incluyó también un análisis de la cobertura de las bacterias fecales por IgG y la composición de azúcares de superficie del ecosistema bacteriano. Las técnicas empleadas en este punto y el flujo de trabajo de análisis se ilustran en la figura 22 y 5A.

3.1. Análisis de la respuesta inmunitaria IgA e IgG hacia la microbiota fecal

Como se ha descrito anteriormente, los ratones B1KO presentan en homeostasis una disminución significativa en la concentración de IgA libre, pero frecuencias similares de bacterias cubiertas por IgA en comparación con ratones WT (Fig. 9C, 9D). Tras el desarrollo del lupus, se observó que la ausencia de *Bank1* ejercía efectos

A) — Secuenciación de bacterias inductoras de respuesta IgA —



B) — Análisis multiparamétrico a nivel de célula única —

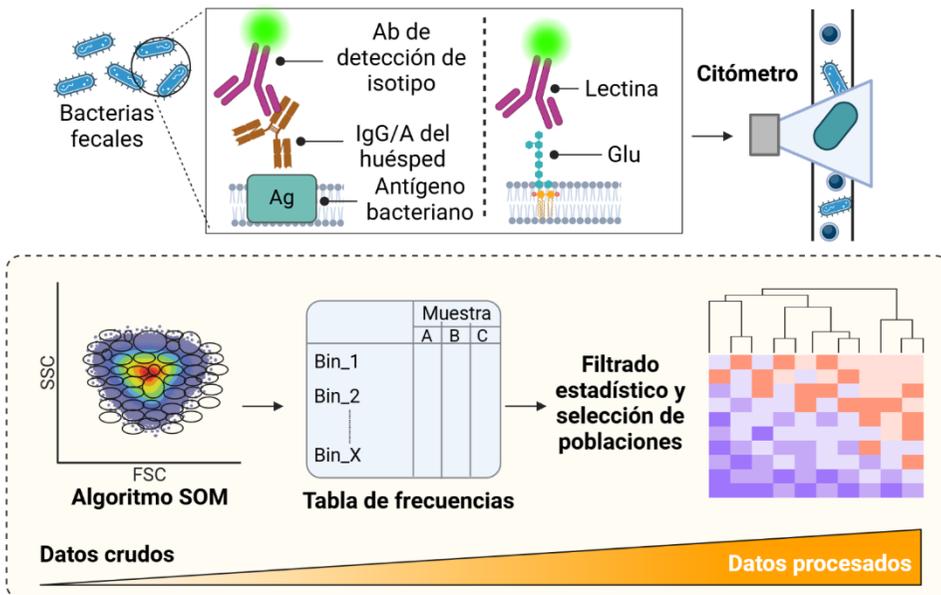


Figura 22. Representación gráfica de las dos técnicas usadas para caracterizar la respuesta inmunitaria hacia la microbiota fecal. A) Tinción de la respuesta IgA mediante

anticuerpos acoplados a fluorocromos para su selección por citometría de flujo y separación de las poblaciones IgA⁺ e IgA⁻ (*sorting*). Las bacterias de cada grupo fueron identificadas mediante amplificación y secuenciación del ARNr 16S (V4). B) Análisis multiparamétrico de célula única para el estudio de las inmunoglobulinas pegadas a las bacterias y el patrón de azúcares de las bacterias. Mediante la adición de anticuerpos acoplados a fluorocromos y la clusterización mediante un mapa de organización autónomo (SOM) se generaron *bins* bacterianas según su similitud en los parámetros analizados. El procesamiento de estos datos incluye el análisis de frecuencia de las *bins* generadas, la aplicación de test estadísticos para el filtrado y la selección, y la visualización variada de aquellas poblaciones con las diferencias más significativas (caracterizadas por menores valores de p).

diferentes en las concentraciones libres de IgA y el pegado de esta inmunoglobulina hacia las bacterias fecales en función del modelo usado (Fig. 21F-I). Ante esta observación se hipotetizó que la diana de la IgA secretada en el intestino de ratones *Bank1*^{-/-} y *Bank1*^{+/+} podría diferir en estado estacionario, y además, cambiar con tendencias diferentes tras la inducción y desarrollo de lupus.

La identificación de las bacterias fecales clasificadas por citometría de flujo según su pegado de IgA (Fig. 22A) y el posterior análisis LEfSe de los taxones identificados indicó que, en condiciones basales, los ratones WT presentan un enriquecimiento en *Akkermansia muciniphila* y *Blautia producta*, así como especies de la familia *Lachnospiraceae* y de los géneros *Oscillospira* y *Ruminococcus* dentro de su fracción positiva. En los ratones B1KO, sin embargo, los taxones dominantes dentro de las bacterias con respuesta IgA⁺ fueron los géneros *Bacillus* y *Corynebacterium*. (Fig. 23A). Tras la inducción de una respuesta sistémica en estos ratones mediante la aplicación del IMQ, la respuesta IgA en los ratones WT estaba enriquecida en bacterias del orden *Streptophytahila* y la especie *Acinetobacter guillouiae* en comparación con los ratones B1KO, cuyas bacterias más diferenciales en la fracción IgA⁺ fueron *Nevskia ramosa*, *Clostridium cocleatum*, *Prevotella copri* y especies de la familia *Erysipelotrichaceae* (Fig. 23B).

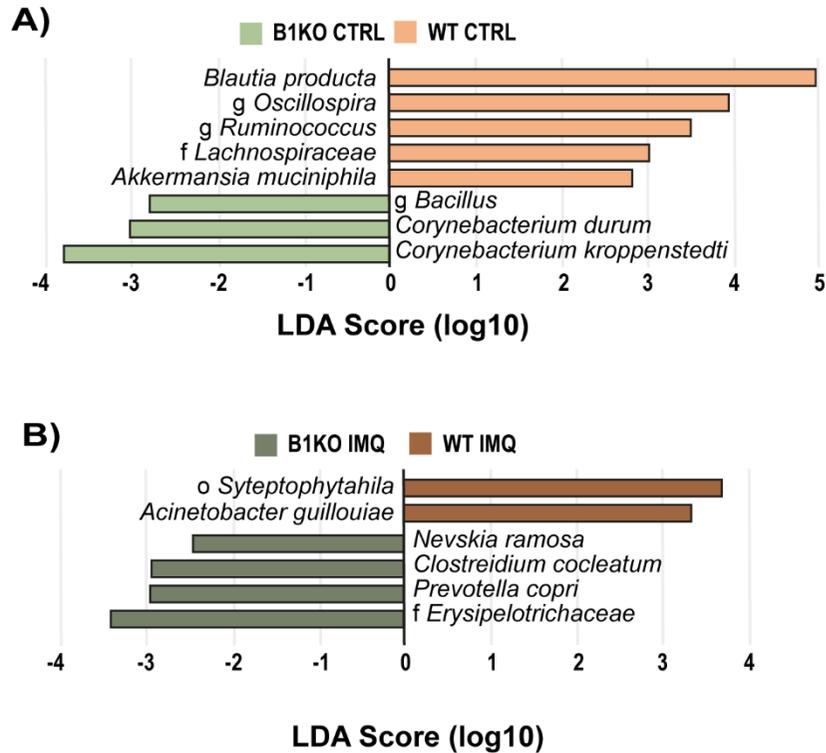


Figura 23. La ausencia de *Bank1* modifica la composición de la fracción de bacterias cubierta por IgA intestinal. A-B) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de las especies encontradas en la fracción IgA+ de bacterias fecales de ratones WT y B1KO control (no tratados con IMQ) (A) y tratados con IMQ (B). Los gráficos muestran las especies con mayores cambios entre grupos representativas de dos experimentos independientes.

Por su parte, el análisis multiparamétrico de célula única de la microbiota intestinal (Fig. 22B) permitió identificar las 20 poblaciones (denominadas en este análisis como *bins*) que mostraron los cambios más notables en su abundancia relativa entre los ratones *Bank1*^{-/-} y *Bank1*^{+/+}, filtradas según su significación estadística. Tras su identificación, se realizaron análisis de enriquecimiento entre genotipos en cada una de las condiciones. La representación visual de dichas poblaciones mediante sus valor medio en cada parámetro permitió caracterizar de forma clara la asociación de ciertas características fenotípicas para uno u otro grupo.

La señalización por Bank1 regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

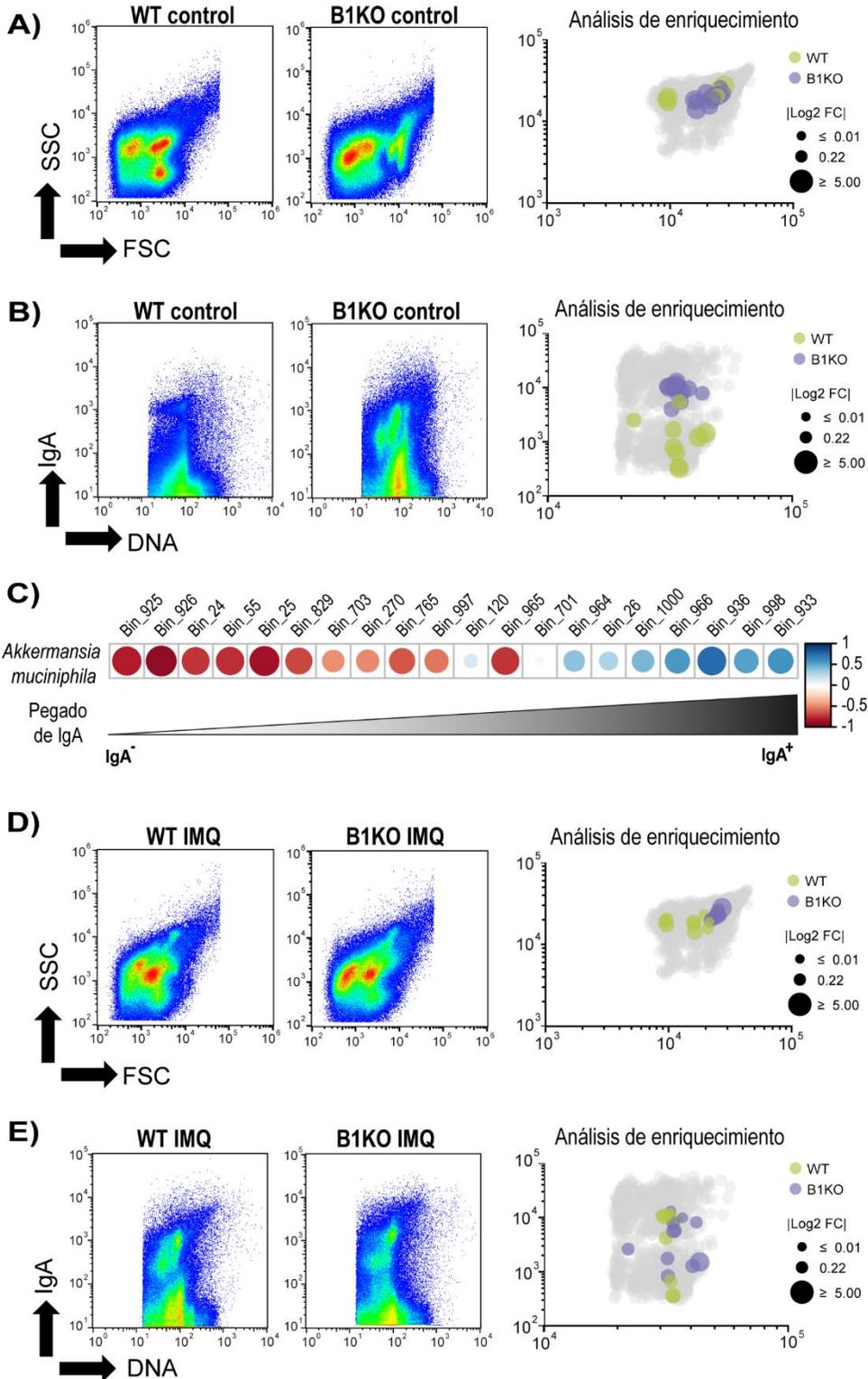


Figura 24. La ausencia de *Bank1* regula el pegado de IgA hacia las bacterias fecales en estado estacionario y tras la inducción de lupus. A, B, D, E) Izquierda: gráficos de puntos representativos de diversos parámetros en ratones WT y B1KO control (A, B) y tratados con IMQ (D, E). Derecha: representación de los valores medios de FSC y SSC de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (WT o B1KO) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). A) Representación del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las poblaciones con más variación entre ratones WT (n=4) y B1KO (n=4) control. B) Representación de la cobertura de IgA y el perfil de ADN de las poblaciones con más variación entre ratones WT (n=4) y B1KO (n=4) control. C) Análisis de correlación entre la frecuencia relativa de *Akkermansia muciniphila* en el contenido fecal de ratones WT y B1KO control y la frecuencia de las *bins* identificadas en el análisis multiparamétrico, ordenadas según el pegado de IgA. El código de color representa el valor del coeficiente (r) de Spearman. D) Representación del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las poblaciones con más variación entre ratones WT (n=6) y B1KO (n=6) tratados con IMQ. E) Representación de la cobertura de IgA y el perfil de DNA de las poblaciones con más variación entre ratones WT (n=6) y B1KO (n=6) tratados con IMQ.

El análisis de enriquecimiento entre ratones WT y B1KO no tratados con IMQ mostró una distribución heterogénea en tamaño y complejidad (Fig. 24A), pero una clara distinción en la distribución del espectro de pegado de IgA. Así, aquellas bacterias presentes en la fracción IgA⁺ estaban enriquecidas en los ratones B1KO y las distribuidas en la fracción IgA⁻ fueron más predominantes en los ratones WT (Fig.24B). Esta metodología fue validada mediante la correlación de la abundancia de *Akkermansia muciniphila* en las muestras fecales globales y las diferentes *bins* ordenadas según su pegado de IgA. En dicho análisis se encontró una fuerte asociación entre *Akkermansia muciniphila* y las poblaciones inductoras de una respuesta IgA (Fig. 24C), confirmando lo hallado en el análisis LefSe (Fig. 23A).

En ratones tratados con IMQ, se encontró que, entre las poblaciones que más variaban en abundancia entre ambos genotipos, aquellas con un mayor tamaño y complejidad estaban enriquecidas en ratones B1KO (Fig. 24D). Aunque el análisis de enriquecimiento de las poblaciones bacterianas indicó un cambio relativo (*fold change*) bajo, sí se observa un enriquecimiento general de las poblaciones diferenciales en los ratones B1KO (12 de las 20 poblaciones seleccionadas), con una cobertura variable de IgA (Fig. 24E).

Figura 25. Cinética temporal de los parámetros FSC y SSC de las poblaciones bacterianas con las mayores variaciones de frecuencia entre ratones del modelo TLR7Tg. Gráficos de puntos representativos de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) en ratones WT (n=2-4), TLR7Tg (n=4-5) y TLR7Tg/B1KO (n=4-5) a edades jóvenes (12-15 semanas), maduras (23-25 semanas) y envejecidas (30-32 semanas). Debajo de los gráficos de puntos se representan los valores medios de FSC y SSC de las poblaciones filtradas y seleccionadas, divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT vs TLR7Tg, WT vs TLR7Tg/B1KO y TLR7Tg vs TLR7Tg/B1KO. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

Para el estudio de la respuesta IgA hacia las bacterias fecales en el modelo espontáneo se diseñó un flujo de trabajo que permitiera analizar con más detalle el efecto de la eliminación de *Bank1*. Dada la naturaleza progresiva del desarrollo y establecimiento del lupus en este modelo, se aplicó el análisis multiparamétrico por citometría de flujo a nivel de célula única a muestras obtenidas a lo largo del curso de la enfermedad. Para ello, se establecieron tres puntos temporales principales: el primero de ellos se estableció coincidiendo con las primeras manifestaciones fenotípicas, a las 12-15 semanas de edad (etapa de ‘juventud’); el segundo punto se sitúa a las 23-25 semanas, con las manifestaciones de gravedad media-alta (etapa de ‘madurez’); finalmente, el último punto de esta cinética se ubicó a las 30-32 semanas de edad, donde se alcanza el fenotipo más marcado y la mayor penetrancia del modelo (etapa de ‘vejez’).

En el periodo de juventud, las poblaciones bacterianas cuyas frecuencias diferían más entre los tres grupos analizados en este modelo (WT, TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO) tenían valores bajos de FSC y SSC (Fig. 25). Sin embargo, las propiedades físicas de las poblaciones más diferenciales entre los grupos se ven modificadas con la edad de los ratones analizados, evolucionando hacia poblaciones más grandes y complejas a edades más avanzadas (ratones maduros) y alcanzando su mayor valor de ambos parámetros en el periodo de vejez (Fig. 25).

La señalización por Bank1 regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

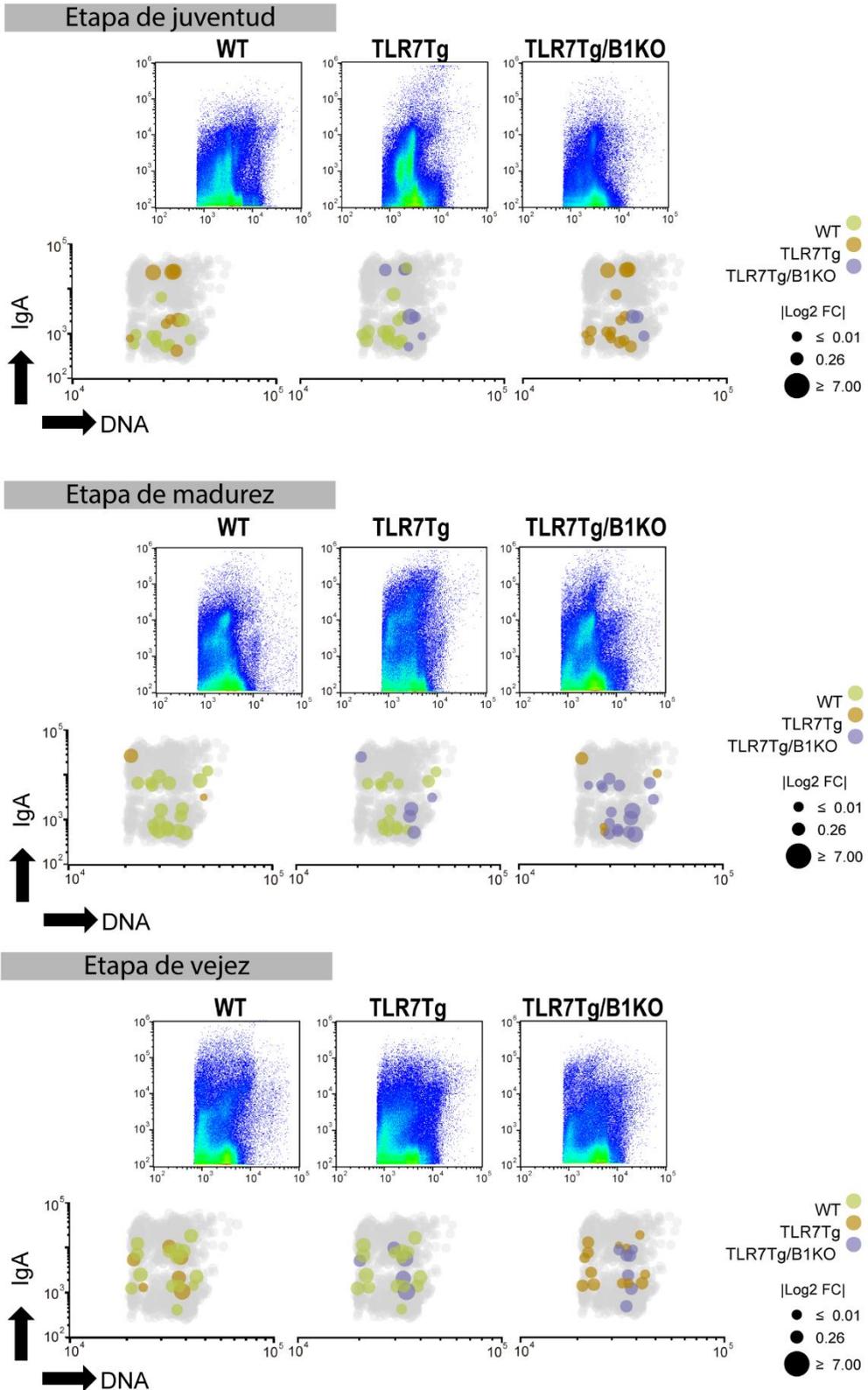


Figura 26. Cinética temporal de la cobertura de IgA y el perfil de ADN de las poblaciones bacterianas con las mayores variaciones de frecuencia entre ratones del modelo TLR7Tg. Gráficos de puntos representativos de la cobertura de IgA y el perfil de DNA en ratones WT (n=2-4), TLR7Tg (n=4-5) y TLR7Tg/B1KO (n=4-5) a edades jóvenes (12-15 semanas), maduras (23-25 semanas) y envejecidas (30-32 semanas). Debajo de los gráficos de puntos se representan los valores medios de pegado de IgA y de ADN de las poblaciones filtradas y seleccionadas, divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT vs TLR7Tg, WT vs TLR7Tg/B1KO y TLR7Tg vs TLR7Tg/B1KO. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

El pegado de IgA hacia las poblaciones filtradas también presentó una dinámica diferente entre los grupos con el avance de la enfermedad. En ratones jóvenes, las poblaciones con las frecuencias más significativamente diferentes entre los tres grupos estaban en la fracción IgA⁻ y se encontraban mayormente enriquecidas en ratones WT. Sin embargo, dentro de esta tendencia, la magnitud del cambio relativo era más notable entre los ratones TLR7Tg y los WT que entre los TLR7Tg/B1KO y los WT (Fig. 26). En la etapa de madurez de la enfermedad en estos ratones, las poblaciones más diferenciales entre genotipos mostraron una mayor variabilidad en su cobertura de IgA, con un perfil muy similar de enriquecimiento de los ratones WT y TLR7Tg/B1KO frente a los ratones TLR7Tg, que mostraron enriquecimiento en solo 3 de las 20 poblaciones filtradas (Fig. 26). En ratones envejecidos, los ratones TLR7Tg/B1KO presentaron un perfil de enriquecimiento de poblaciones muy similar al de los TLR7Tg, con una marcada disminución frente a los ratones WT (Fig. 26).

El seguimiento temporal de la cobertura y las frecuencias de las poblaciones bacterianas en el modelo espontáneo mediado por la sobreexpresión de *Tlr7* permitió el análisis exhaustivo de las dinámicas inmunitarias hacia la microbiota (Fig. 27). Las poblaciones que presentan las modificaciones más marcadas en su abundancia a edades tempranas presentan abundancias similares entre WT y TLR7Tg/B1KO, especialmente en la fracción IgA⁺. Con el avance de la enfermedad, las poblaciones

diferenciales entre los grupos en estado de madurez cambian de identidad, y los ratones TLR7Tg/B1KO siguen presentando una dinámica de frecuencias que se asemeja más a los WT que a los TLR7Tg (tanto en la fracción IgA⁻ como en la IgA⁺). En el punto de vejez, el más avanzado de este modelo, los ratones TLR7Tg/B1KO presentan frecuencias indistinguibles a simple vista de las halladas en ratones TLR7Tg. Por último, cabe destacar que la identidad de las poblaciones con frecuencias más significativamente diferentes entre ratones WT, TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO cambia con la edad, donde las poblaciones más diferenciales en la edad joven presentan frecuencias comparables entre los tres grupos a edades maduras y envejecidas (Fig. 27).

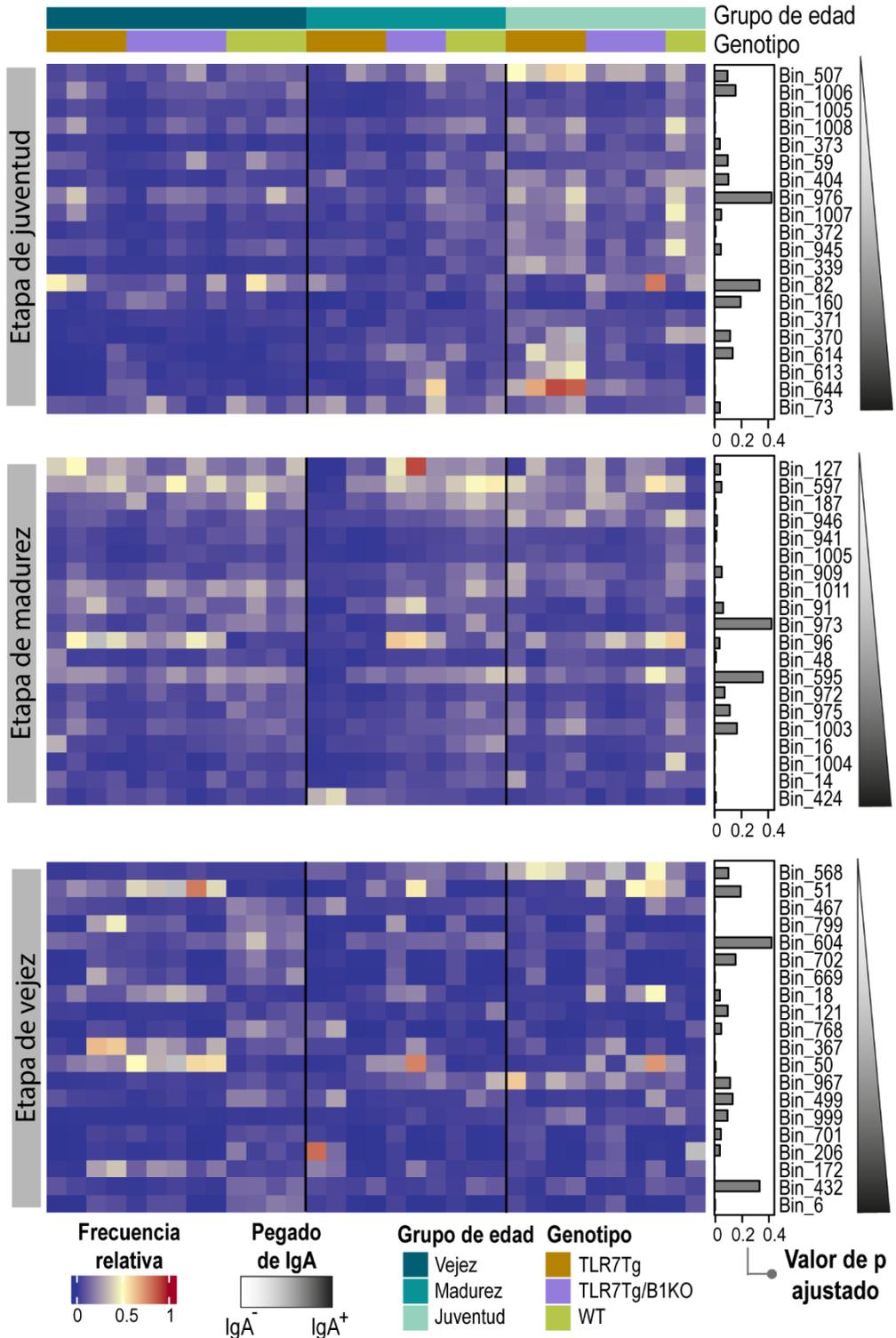
3.2. Análisis de la composición de la microbiota.

Para la caracterización de la microbiota, se realizaron dos estudios paralelos. En primer lugar, se hizo uso de la secuenciación global del ARNr 16S (V4) de la totalidad de las bacterias fecales para estudiar la composición taxonómica del conjunto bacteriano. En paralelo, se implementó un panel de lectinas en el análisis multiparamétrico. Dichas estructuras poseen diferentes afinidades a azúcares, por lo que permiten analizar el patrón de glucosilación presente en la superficie de las bacterias estudiadas (Fig. 14 y 5).

3.2.1. Composición de los azúcares de superficie bacterianos intestinales.

El estudio del patrón de glucosilación de las bacterias fecales procedentes de ratones WT y B1KO en estado estacionario mostró una reducción significativa en la frecuencia de las *bins* WGA⁺ y STL⁻ en la microbiota fecal de los ratones deficientes para *Bank1* en comparación con aquella de los ratones WT. No se encontraron diferencias significativas en el pegado de PNA y ConA entre ambos grupos en estas condiciones (Fig. 28).

Bins con los cambios de frecuencia más significativos entre genotipos en cada grupo de edad



La señalización por *Bank1* regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

Figura 27. Mapa de calor de las frecuencias relativas de las poblaciones bacterianas seleccionadas en cada punto de la cinética temporal del modelo TLR7Tg. Representación de la frecuencia relativa (gradiente rojo-amarillo-azul) de las poblaciones bacterianas filtradas y seleccionadas para los ratones WT (n=2-4), TLR7Tg (n=4-5) y TLR7Tg/B1KO (n=4-5) a edades jóvenes (12-15 semanas, bloque de arriba), maduras (23-25 semanas, bloque central) y envejecidas (30-32 semanas, bloque de abajo). Cada columna representa una muestra individual. Las poblaciones están representadas en cada bloque temporal según su pegado de IgA (gradiente blanco - negro). Cada bloque representa las frecuencias de las poblaciones bacterianas seleccionadas para un bloque de edad específico (indicado en el cuadro gris de la izquierda) comparadas en todas las etapas temporales. En el bloque superior, las poblaciones que distinguen a los ratones WT, TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO jóvenes se representan también a edades maduras y envejecidas, mostrando cómo estas diferencias se diluyen con el tiempo. De manera similar, el bloque central refleja la frecuencia de las poblaciones que diferencian a los tres genotipos en la madurez, mientras que en el bloque inferior se representan las poblaciones con las variaciones más significativas en la vejez. Test estadístico de Kruskal Wallis y ajuste del valor de p por el método de Bonferroni-Hochberg.

Tras la inducción de la enfermedad, se encontraron diferentes modificaciones en la composición de azúcares del ecosistema en función de la naturaleza aguda (IMQ) o crónica (TLR7Tg) del modelo usado para la emulación del lupus.

En ratones tratados con IMQ se encontró que las poblaciones diferenciales entre ratones WT y B1KO presentaron patrones similares en la unión de ConA, PNA y WGA, mientras que las *bins* con un alta frecuencia de pegado de STL estaban predominantemente enriquecidos en los ratones B1KO (Fig. 29).

Para el estudio de los patrones de glucosilación en el modelo de TLR7Tg se realizó, siguiendo la descripción hecha en 3.1, una cinética temporal en ratones jóvenes, maduros y envejecidos. En el grupo joven, la ausencia de *Bank1* en el fondo TLR7Tg resultó en una expansión de bacterias ConA⁺ en comparación con ratones WT y TLR7Tg (Fig. 30A, B). Las fracciones WGA⁺, PNA⁺ y STL⁺ se encontraron más enriquecidas en ratones enfermos (TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO) respecto de ratones sanos WT, pero la magnitud de este cambio relativo fue mayor en la comparativa de ratones TLR7Tg vs WT (Fig. 30A, B). No se encontraron diferencias en los patrones de cobertura por ConA (Fig. 30A, B). En ratones maduros, se mantuvo la similitud de

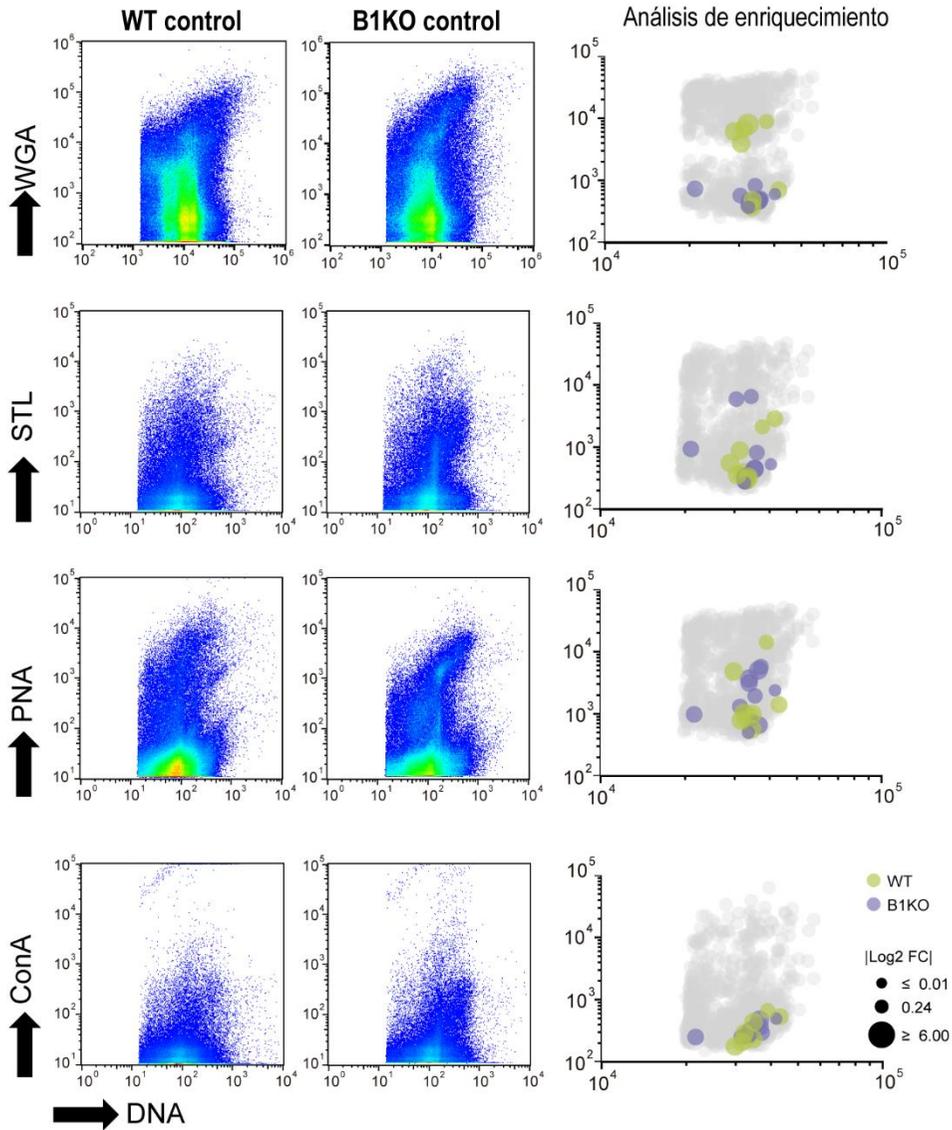


Figura 28. La ausencia de *Bank1* modifica el patrón de azúcares de superficie en estado estacionario. Izquierda: gráficos de puntos representativos del pegado de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT (n=4) y B1KO (n=4) control. Derecha: representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (WT o B1KO) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

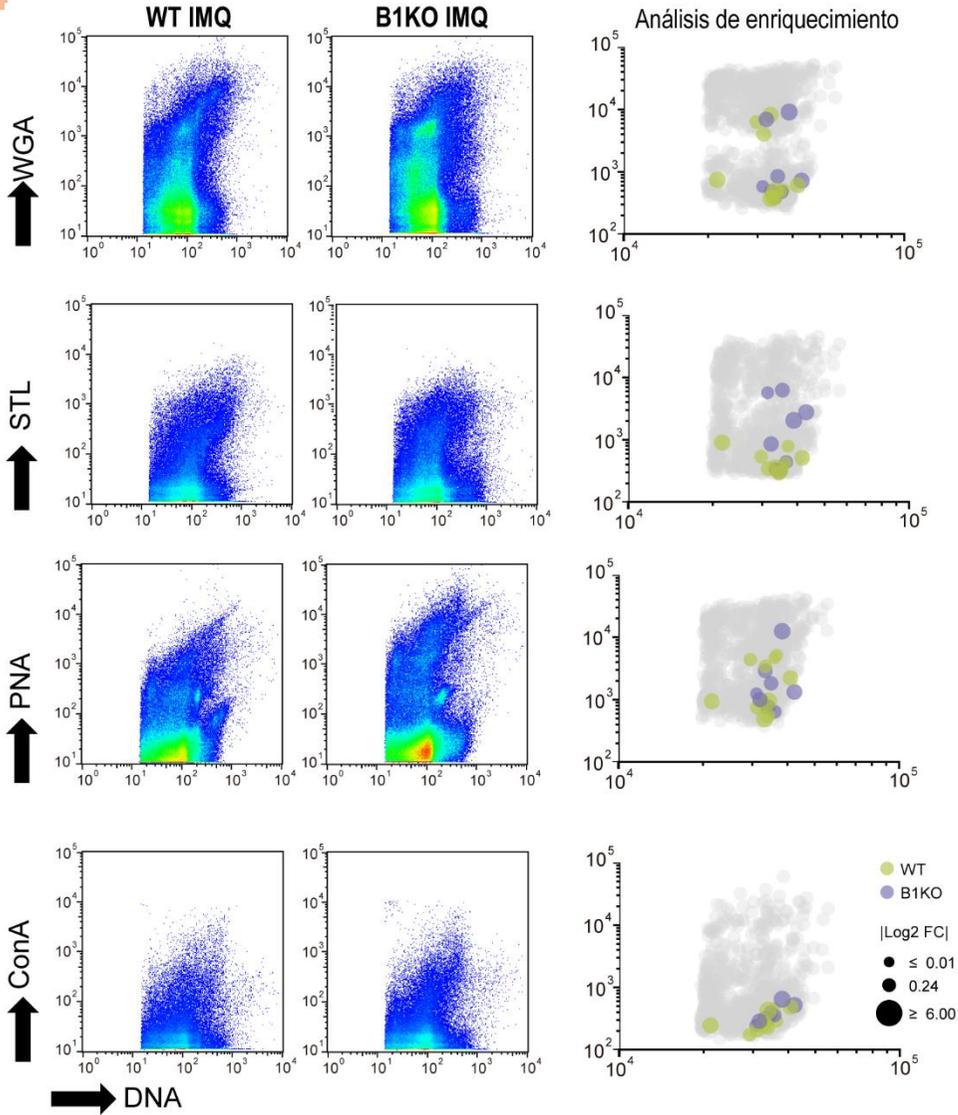
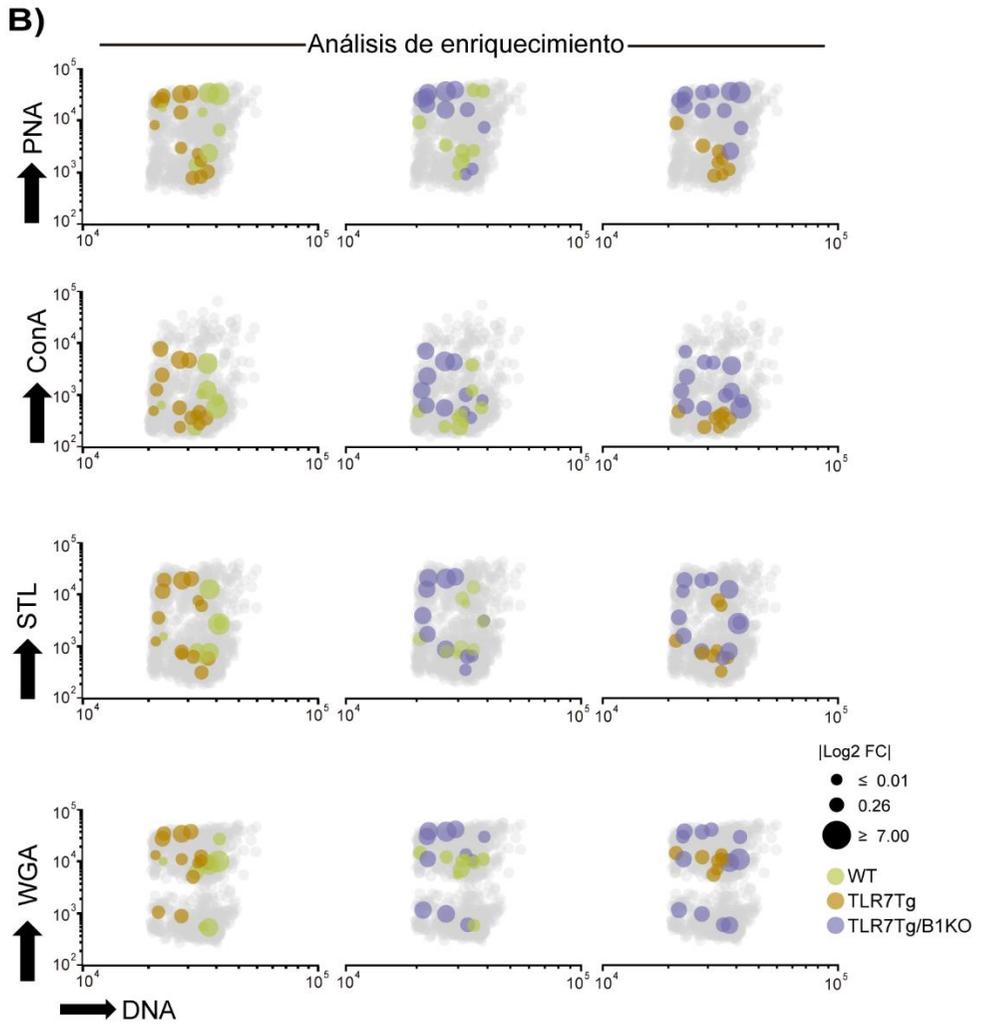
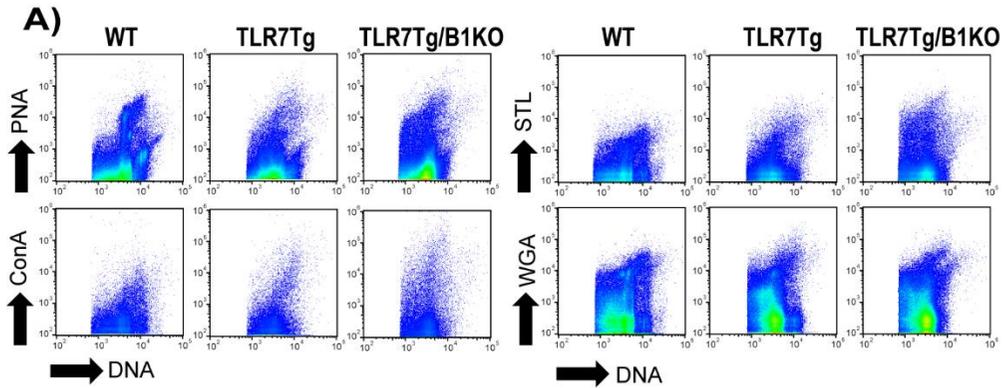


Figura 29. La ausencia de *Bank1* modifica el patrón de azúcares de superficie tras el tratamiento con IMQ. Izquierda: gráficos de puntos representativos de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT ($n=6$) y B1KO ($n=6$) tratados con IMQ. Derecha: representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (WT o B1KO) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

Etapa de juventud



La señalización por *Bank1* regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

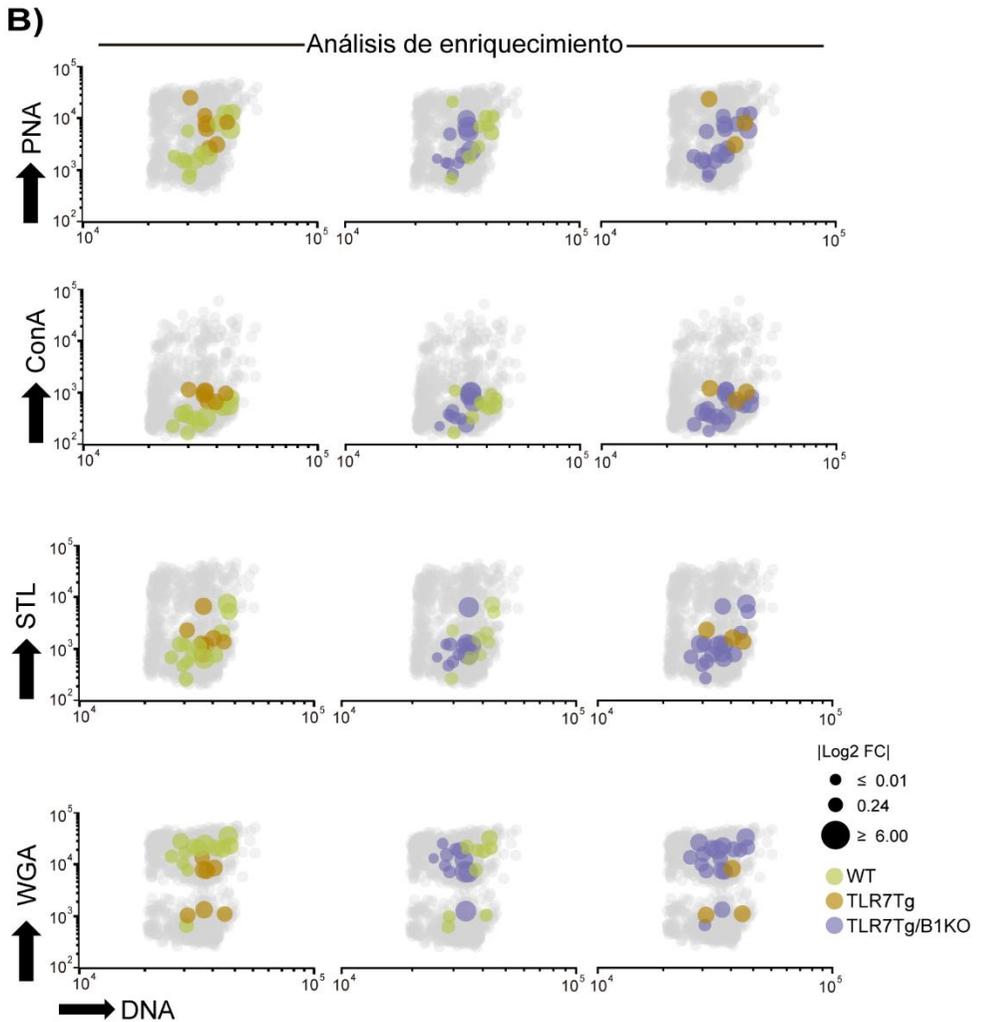
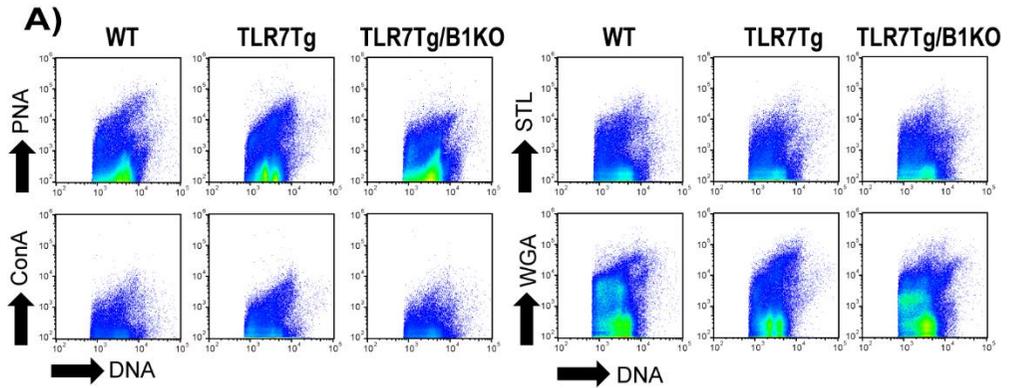
Figura 30. La ausencia de *Bank1* modifica el patrón de azúcares de superficie en el modelo TLR7Tg a edades jóvenes. A) gráficos de puntos representativos de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT (n=2-4), TLR7Tg (n=4-5) y TLR7Tg/B1KO (n=4-5) a edades jóvenes (12-15 semanas). B) Representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT vs TLR7Tg, WT vs TLR7Tg/B1KO y TLR7Tg vs TLR7Tg/B1KO. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

patrones de enriquecimiento entre ratones WT y TLR7Tg/B1KO, presentando ambos grupos una mayor frecuencia de poblaciones WGA⁺, ConA⁻ y PNA⁻ respecto de las bacterias de ratones TLR7Tg (Fig. 31A, B); la cobertura por STL fue, a esta edad, similar y heterogénea entre los grupos (Fig. 31A, B). Por último, el estudio en el punto temporal de vejez indicó que tanto los ratones TLR7Tg como los TLR7Tg/B1KO poseían una mayor abundancia de bacterias ConA⁺, WGA⁻ y STL⁻, pero no de bacterias PNA⁺, en comparación con sus homólogos WT (Fig. 32A, B).

3.2.2. Composición taxonómica de la microbiota intestinal.

En primer lugar, se encontró en la microbiota de ratones WT y B1KO control (no tratados con IMQ) una alta frecuencia de bacterias pertenecientes a la familia S24-7 (dentro del orden *Bacteroidales*), seguida de *Akkermansia muciniphila* (Fig. 33A). La deficiencia de *Bank1* en estado estacionario indujo un cambio significativo en la distancia filogenética de Faith (p=0.02), pero no alteró el índice de Pielou (p=0.3) (Fig. 33B) ni el índice de Shannon (p=0.28). La beta diversidad, por su parte, se caracterizó a través de un PCA, y su representación gráfica muestra la separación espacial significativa (PERMANOVA p=0.001) entre los ratones WT y B1KO en condiciones basales (Fig. 33C).

Etapa de madurez



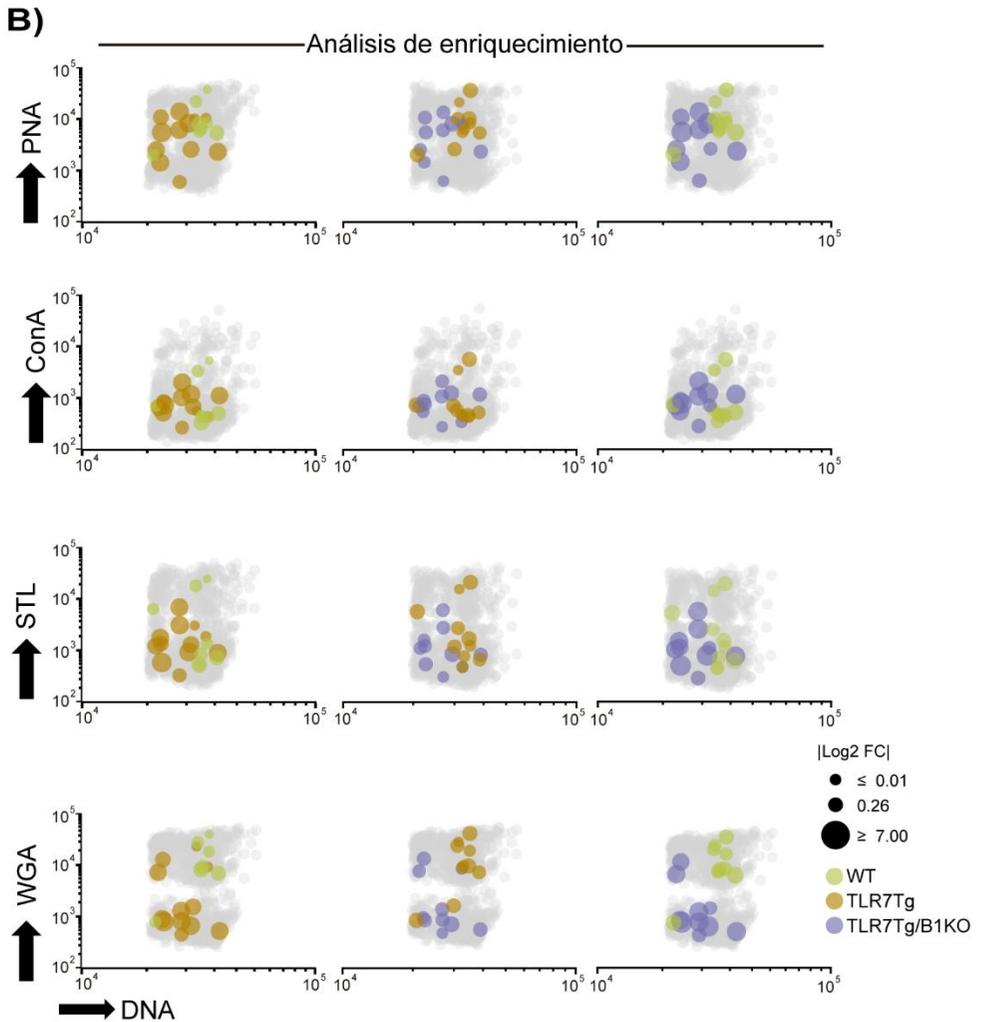
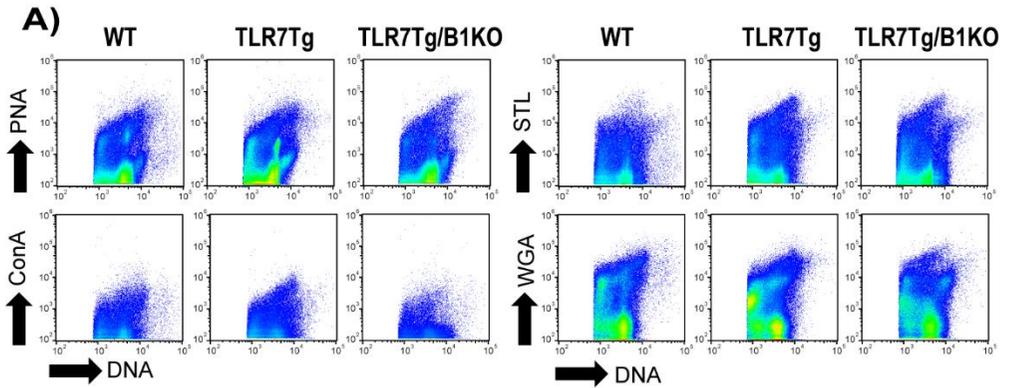
La señalización por Bank1 regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

Figura 31. La ausencia de *Bank1* modifica el patrón de azúcares de superficie en el modelo TLR7Tg a edades de madurez. A) gráficos de puntos representativos de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT (n=2-4), TLR7Tg (n=4-5) y TLR7Tg/B1KO (n=4-5) a edades de madurez (23-25 semanas). B) Representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT vs TLR7Tg, WT vs TLR7Tg/B1KO y TLR7Tg vs TLR7Tg/B1KO. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

Para completar el análisis de la microbiota basal, se llevó a cabo un análisis LEfSe, el cual reveló los taxones con la abundancia más diferencial en el intestino de ratones WT y B1KO. Entre los taxones con mayores diferencias de abundancia, las especies *Akkermansia muciniphila*, *Desulfovibrio C21_C20*, *Clostridium aldense* junto con el género *Lactobacillus* y la familia *Enterobacteriaceae* aparecieron como colonizadores diferenciales de los ratones B1KO. Por su parte, la microbiota de ratones WT apareció enriquecida en taxones de los órdenes *Clostridiales* y *Pseudomonadales*, a la par que las familias *S24-7* y *Ruminococcaceae*, los géneros *Sphingomonas*, *Dehalobacterium* y las bacterias de la especie *Bifidobacterium psudolongum* (Fig. 33D).

Posteriormente a la inducción del lupus en estos ratones mediante la aplicación de IMQ, se observó que, aunque el taxón mayoritario en ambos grupos seguía siendo la familia *S24-7*, en los ratones B1KO se dio una disminución notable de la frecuencia de *Akkermansia muciniphila* y un incremento de la presencia de *Bacteroides acidifaciens*. En el grupo WT tratado con IMQ no se observó esta tendencia (Fig. 34A). Los análisis de alfa diversidad entre los animales con lupus mostraron que, tras el establecimiento de la enfermedad, ambos grupos presentaban valores comparables de la distancia filogenética de Faith ($p=0.07$) y el índice de Pielou ($p=0.07$) (Fig. 34B). La caracterización de la beta diversidad sí mostró diferencias estadísticamente significativas (PERMANOVA $p=0.001$) entre ambos genotipos.

Etapa de vejez

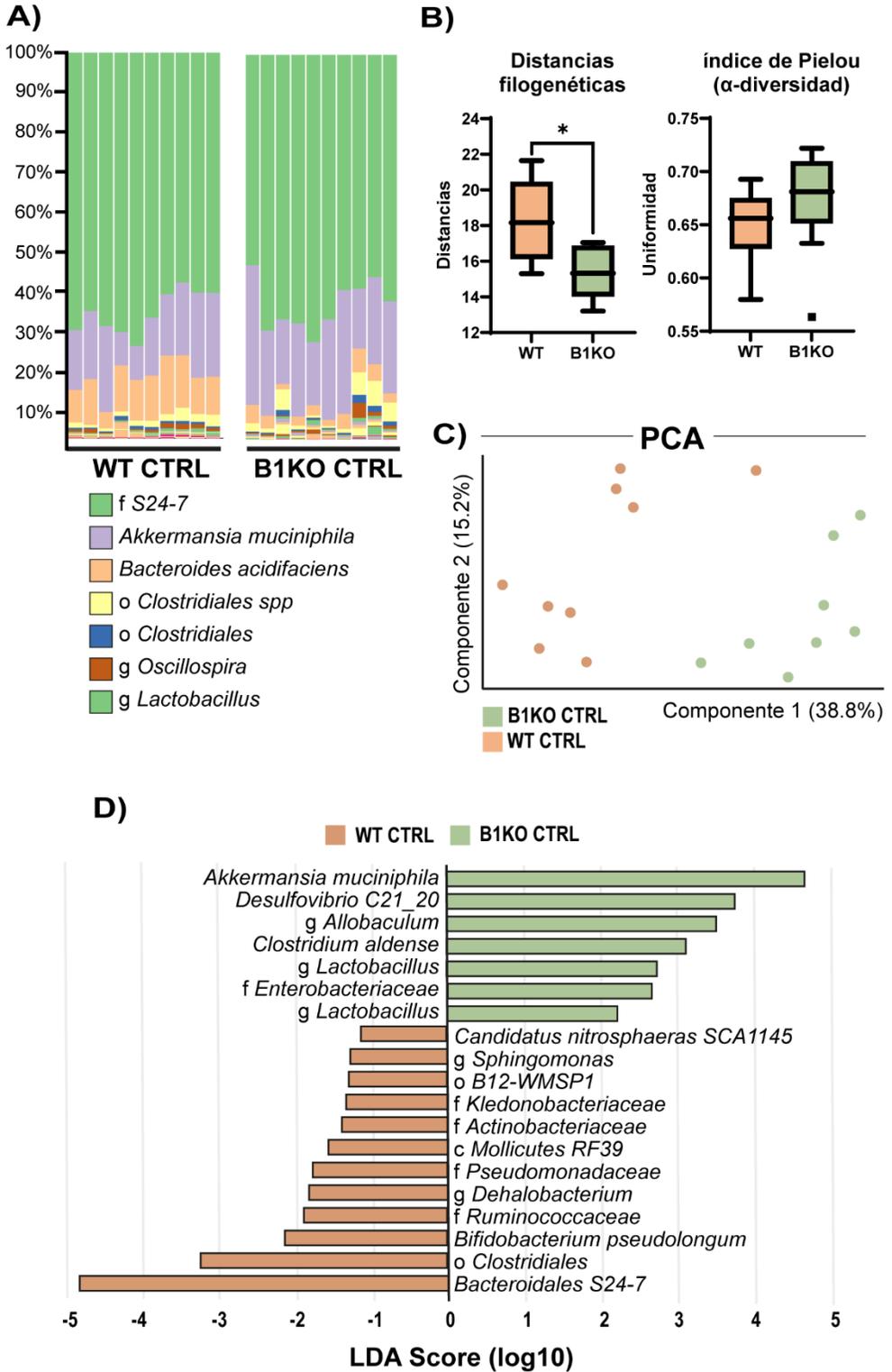


La señalización por Bank1 regula la cobertura de las bacterias fecales por IgA y la composición de la microbiota.

Figura 32. La ausencia de *Bank1* modifica el patrón de azúcares de superficie en el modelo TLR7Tg a edades envejecidas. A) gráficos de puntos representativos de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT (n=2-4), TLR7Tg (n=4-5) y TLR7Tg/B1KO (n=4-5) a edades de vejez (30-32 semanas). B) Representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT vs TLR7Tg, WT vs TLR7Tg/B1KO y TLR7Tg vs TLR7Tg/B1KO. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*).

Gracias al análisis LEfSe se pudo comprobar que, en ratones con lupus tras el tratamiento de IMQ, *A. muciniphila* estaba, en efecto, colonizando diferencialmente el intestino de ambos grupos de ratones, con una mayor abundancia en ratones WT (Fig. 34C). Los ratones B1KO presentaron un enriquecimiento en *Bacteroides acidifaciens*, pero también en otras especies de los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*, las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* y las especies *Parabacteroides distasonis* y *Desulfovibrio c21_c20* (Fig. 34C).

En el modelo espontáneo, por su parte, también se observaron cambios en las abundancias taxonómicas entre los ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO, pero las variaciones entre ambos modelos fueron diferentes. La ausencia de *Bank1* en estos ratones permitió una mayor proliferación de la familia S24-7 y los géneros *Clostridium cocleatum*, *Alistipes putrendinis*, *Helicobacter ganmani* o *Parabacteroides distasonis* entre otros, pero no en ratones TLR7Tg. En ellos, se encontró una mayor abundancia de especies pertenecientes a los géneros *Ruminococcus* y *Allobaculum* (Fig. 35A, B). Además, con el establecimiento de la enfermedad, los ratones TLR7Tg (*Bank1*^{-/-} y *Bank1*^{+/+}) presentaron una marcada proliferación de *Bacteroides acidifaciens* (Fig. 35A). Al analizar de forma conjunta las variaciones de microbiota de ambos modelos, resultó especialmente interesante la fuerte asociación de dos bacterias con los cambios inducidos ante el establecimiento de lupus en ausencia de *Bank1*: *P. distasonis* y *B. acidifaciens*.



La microbiota generada por la ausencia de *Bank1* induce un papel protector en ratones con lupus.

Figura 33. Los ratones B1KO presentan una microbiota diferente en estado estacionario. A) Gráficos de barras con la abundancia relativa de las especies encontradas en ratones WT y B1KO controles (no tratados con IMQ). Cada columna representa una muestra original. B) Representación de la alfa diversidad (distancia filogenética de Faith e índice de Pielou o Uniformidad) entre ratones WT y B1KO no tratados con IMQ. C) Representación de la beta diversidad por PCA. D) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de los ecosistemas bacterianos intestinales. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con $n=6-12$ ratones por grupo. B: Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. $*p\leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

A la luz de estos resultados, se realizó un análisis ANCOM para evaluar de forma conjunta la significancia de las variaciones en la abundancia relativa de las especies en ambos modelos y la magnitud de dichas variaciones. La comparación de ratones con lupus *Bank1*^{-/-} y *Bank1*^{+/+} confirmó que tanto *P. distasonis* como *B. acidifaciens* son especies que exhibían una abundancia diferencial en el intestino de ratones deficientes para *Bank1* en comparación con ratones WT tratados con IMQ (Fig. 35C) y ratones TLR7Tg (Fig. 35D). Los análisis de la composición de la microbiota revelaron de esta forma la existencia de especies sensibles a la señalización de *Bank1* en homeostasis y tras el desarrollo e inducción de lupus.

4. La microbiota generada por la ausencia de *Bank1* induce un papel protector en ratones con lupus.

Los resultados expuestos hasta el momento mediante el uso de los dos modelos de lupus han mostrado que la ausencia de *Bank1* del genoma induce modificaciones a nivel de la respuesta inmunitaria sistémica e intestinal, las cuales a su vez se traducen en una mejora en los síntomas de lupus y, de forma concomitante, cambios en la composición de la microbiota. Por ello, se quiso investigar a continuación si la microbiota generada en los ratones *Bank1*^{-/-} era transferible y si poseía propiedades inmunomoduladoras.

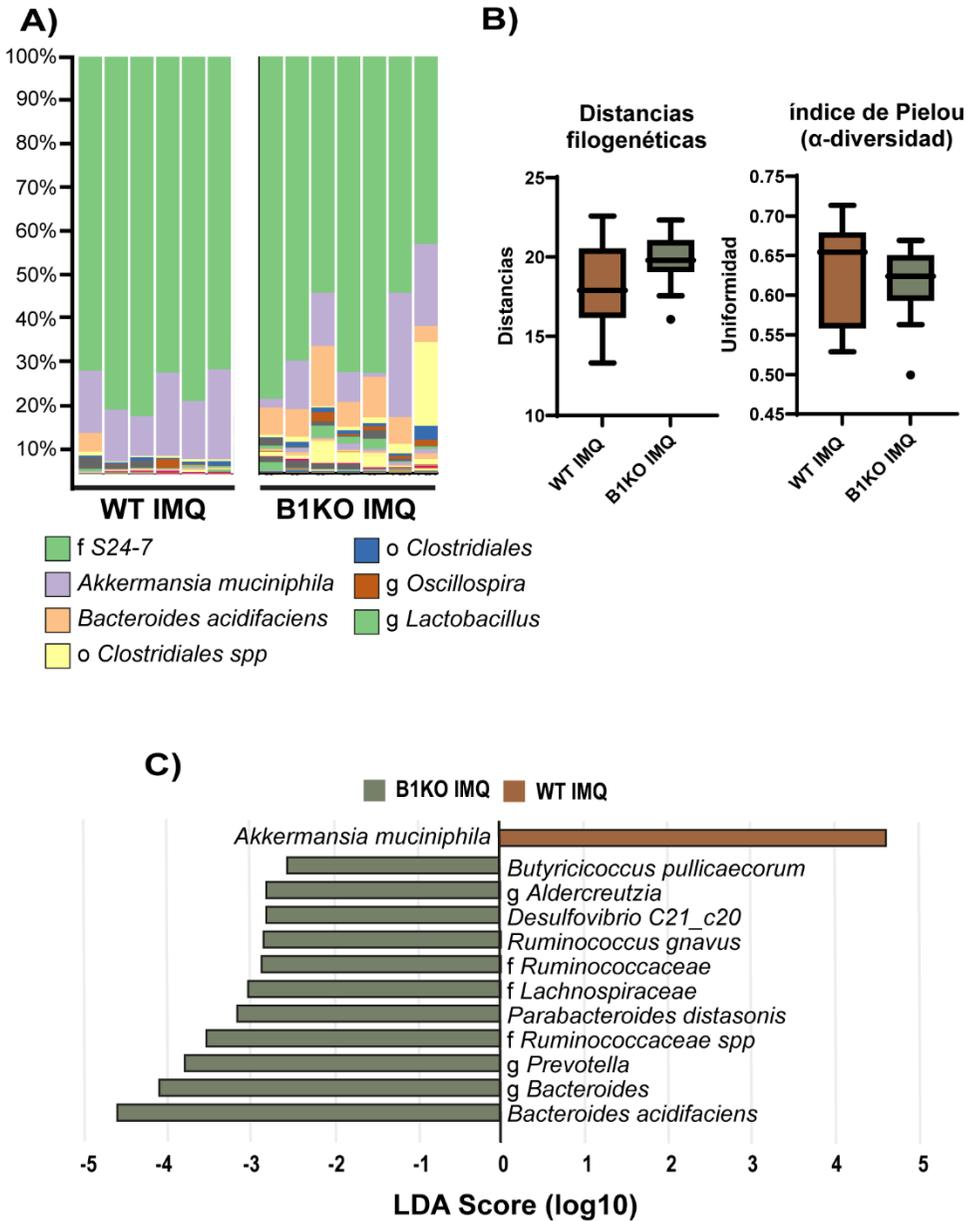


Figura 34. Los ratones B1KO presentan una microbiota diferente tras la inducción de lupus. A) Gráficos de barras con la abundancia relativa de las especies encontradas en ratones WT y B1KO tratados con IMQ. Cada columna representa una muestra original. B) Representación de la alfa diversidad (distancia filogenética de Faith e índice de Pielou o Uniformidad) entre ratones WT y B1KO tratados con IMQ. C) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de los ecosistemas bacterianos intestinales. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=6-12 ratones por grupo. B: Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. La ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

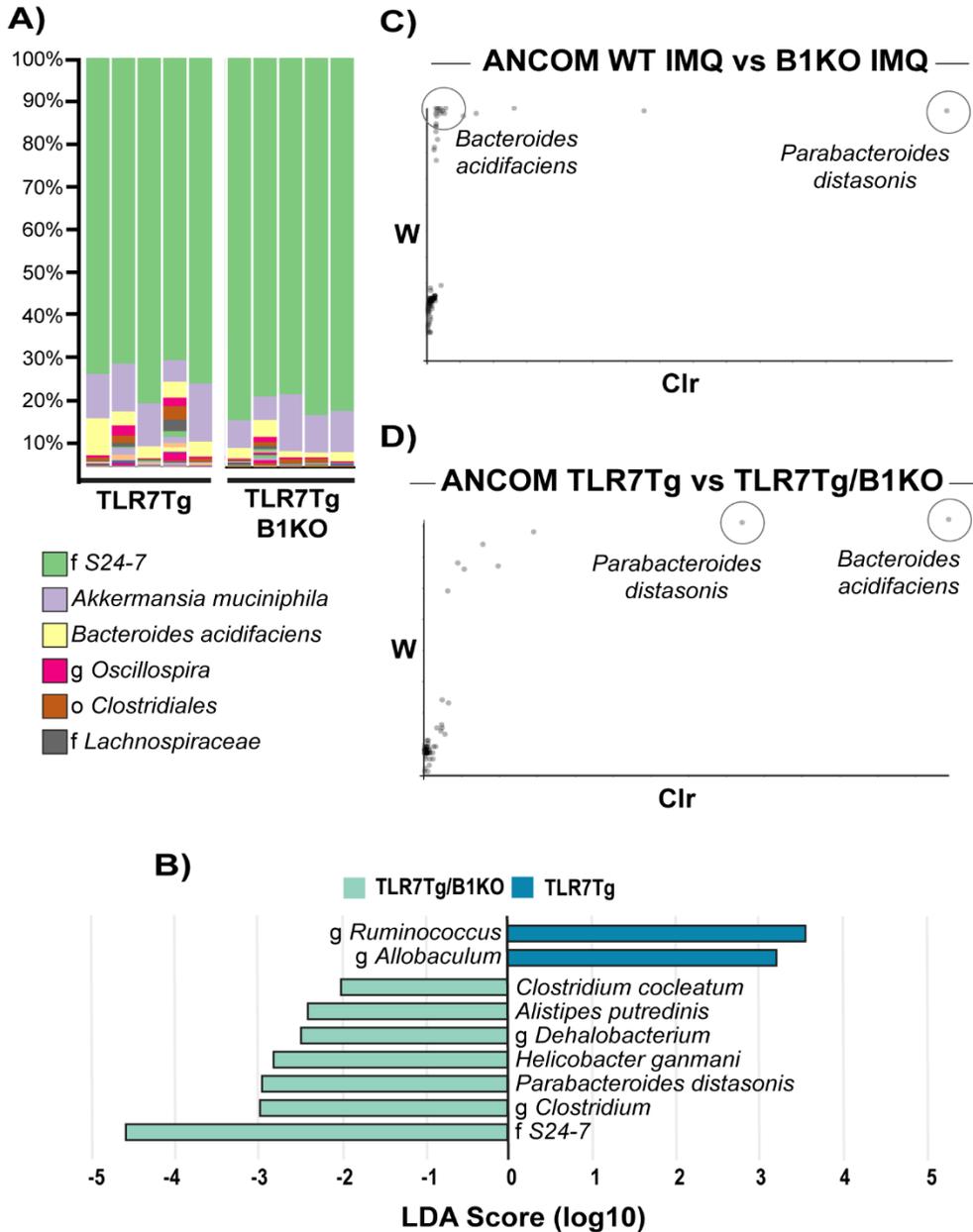


Figura 35. Los ratones TLR7Tg/B1KO presentan cambios en la microbiota similares a los ratones B1KO tratados con IMQ. A) Gráficos de barras con la abundancia relativa de las especies encontradas en ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO. Cada columna representa una muestra original. B) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de los ecosistemas bacterianos intestinales de TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO. C-D) Análisis de composición de microbiomas (ANCOM) en ratones WT y B1KO tratados con IMQ (C) y ratones TLR7Tg y TLR7Tg/B1KO (D). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con $n=5-12$ ratones por grupo en ratones de 20 (modelo IMQ) o 32 (modelo TLR7Tg) semanas de edad.

4.1. La transferencia vertical de la microbiota asociada a la deficiencia de *Bank1* ejerce un papel protector en el desarrollo del lupus.

Con el objetivo de analizar el papel de la microbiota en la regulación del desarrollo de lupus, se desarrolló el modelo agudo de aplicación de IMQ (Fig. 10A) en ratones *littermates* portadores de la microbiota asociada a los ratones B1KO (Fig. 36A). Para este modelo se usaron como animales control homólogos WT y B1KO tratados y no tratados criados en jaulas separadas y provenientes de padre homocigotos (ratones *single cage*) para mantener la microbiota intestinal asociada a cada genotipo por separado.

Tras el establecimiento de este modelo, se evaluó en primer lugar que la normalización de la microbiota no indujera ningún efecto adverso en estos ratones, no encontrándose ninguna señal de esplenomegalia ni secreción de autoanticuerpos anti-ADNdc en los ratones *littermates* (Fig. 36B-D). Replicando los resultados previamente descritos en las figuras 10 y 12, la inducción de lupus en los ratones *single cage* se tradujo en menores niveles de esplenomegalia y de autoanticuerpos IgG2c e IgG total anti-ADNdc, así como una menor severidad en las afecciones renales en los ratones B1KO en comparación con los ratones WT (Fig. 36B-E). Por otro lado, los signos de autoinmunidad a nivel de bazo, riñón y autoanticuerpos manifestados en los ratones *littermates* tras el tratamiento con IMQ fue similar independientemente del genotipo (WT, HET y B1KO) y similar a los niveles de los ratones B1KO *single cage* (Fig. 36B-E).

La secuenciación de la microbiota fecal de los ratones *littermates* y *single cage* tratados con IMQ permitió comprobar la eficacia de la generación de *littermates* para la homogeneización del ecosistema intestinal (Fig. 37A, B).

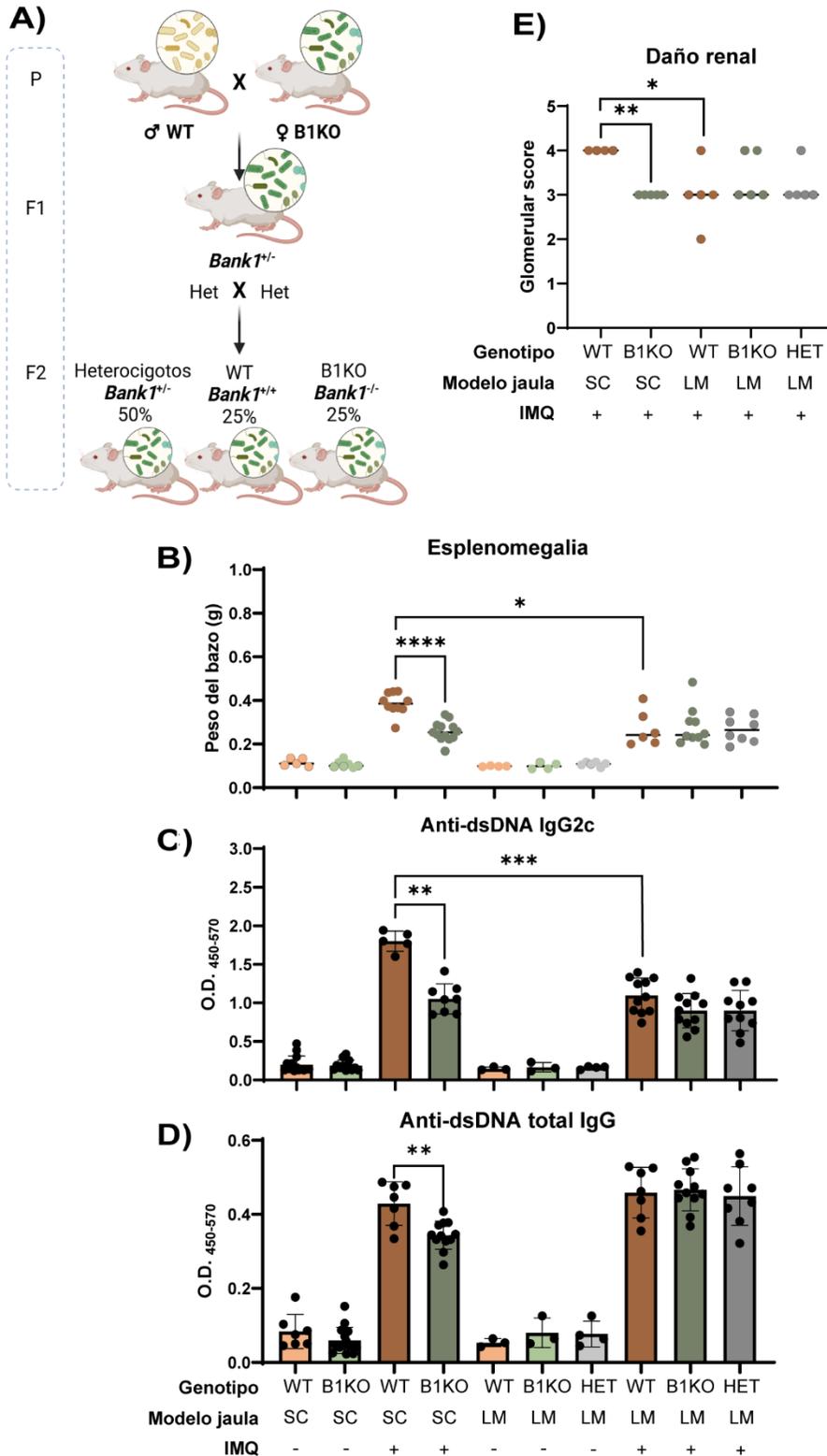


Figura 36. Los ratones *littermates* presentan menor severidad en las manifestaciones de lupus. A) Descripción del modelo de generación de ratones *littermates* portadores de una microbiota asociada al genotipo B1KO (microbiota en color verde). B-E) Caracterización de las afecciones fenotípicas de lupus en ratones WT y B1KO control y tratados con IMQ, criados en condiciones *single cage* o *littermates*. En el caso de *littermates*, se incluyen también ratones HET. B) Representación de la esplenomegalia caracterizada por la masa del bazo. C-D) Niveles de autoanticuerpos de isotipo IgG2c(C) e IgG total (D) anti ADNc en suero medidos por ELISA. E) Estudio del daño renal mediante un sistema de puntuación glomerular basado en el análisis ciego de las micrografías ópticas renales (0: ningún nivel de daño, 5: daño renal elevado). LM: *littermates*, SC: *single cage*. B-E) Datos de dos experimentos independientes con n= 4-7 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001; ****p≤0.0001; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

El análisis por PCA reveló que la composición de los grupos B1KO, WT y HET tratados con IMQ y criados como *littermates* era similar, pero divergía de la mostrada por los ratones WT y B1KO tratados con IMQ mantenidos en condiciones *single cage*, los cuales también mostraban diferencias entre sí (Fig. 37A). Adicionalmente, la distribución de la frecuencia relativa de los taxones más abundantes fue similar entre *littermates* tras el tratamiento con IMQ (Fig. 37B). Por último, se analizó en los ratones *littermates* tratados con IMQ la frecuencia de las especies que manifestaban los cambios más notables entre los ratones B1KO y WT tratados con IMQ criados como *single cage* (*P. distasonis*, *B. acidifaciens* y una disminución de la frecuencia de *A. muciniphila*) (Fig. 26E, 35C). El análisis de estos taxones demostró que las tres especies presentaron frecuencias similares en el contenido fecal de todos los grupos con independencia de su genotipo (Fig. 37C), reforzando el concepto de una microbiota normalizada.

Por otro lado, se encontró en los ratones *littermates* portadores de la microbiota asociada al genotipo *Bank1^{-/-}* que, tras la inducción de lupus, los tres genotipos presentaron niveles significativamente menores de paso paracelular de FITC-dextrano en comparación con los ratones WT *single cage* tratados con IMQ.

La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

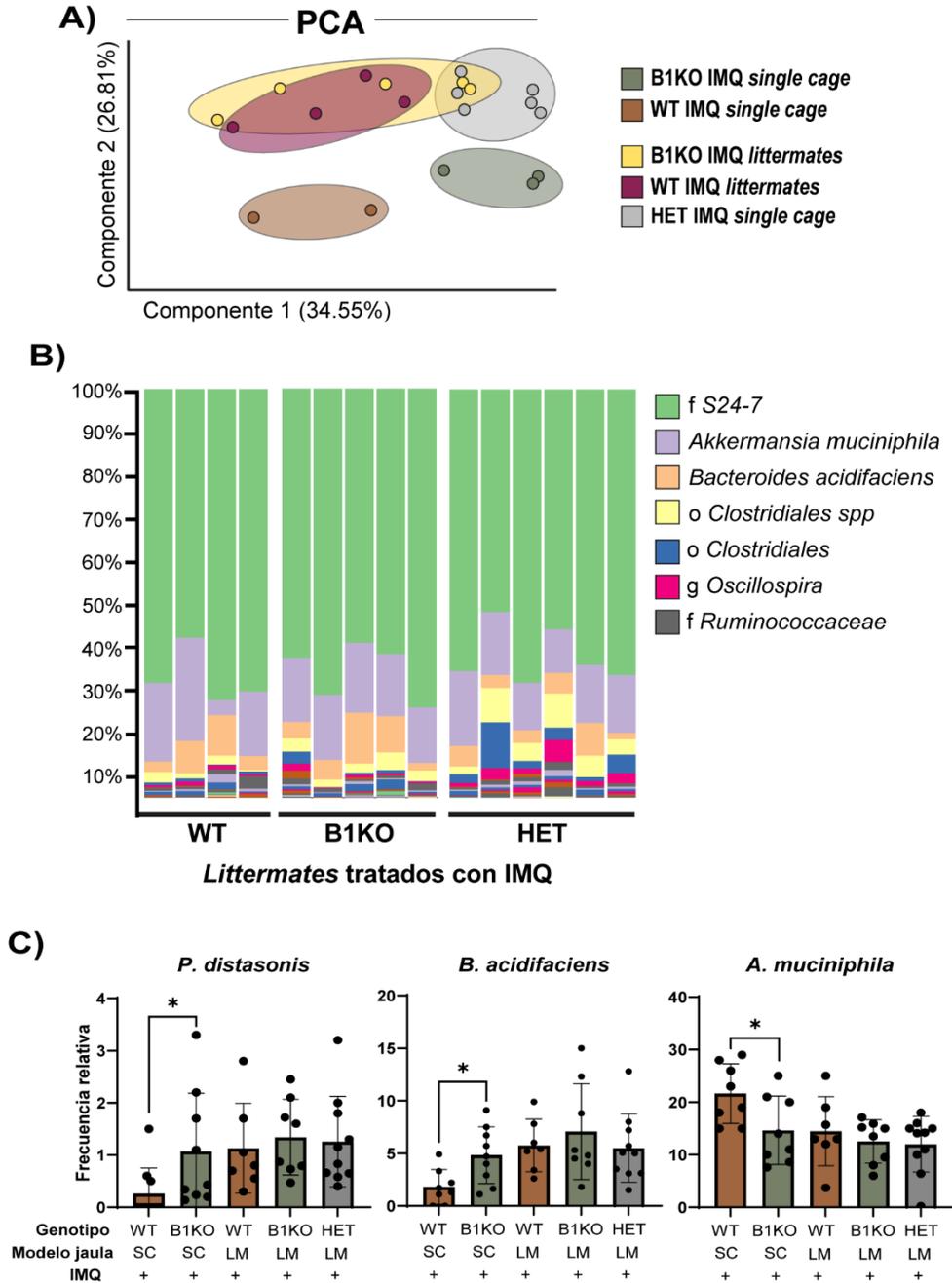


Figura 37. Los ratones *littermates* presentan una microbiota comparable entre genotipos. A) Representación de la beta diversidad por PCA entre ratones WT y B1KO tratados con IMQ crecidos como *single cage* o como *littermates*. En el caso de *littermates*, se incluyen también ratones HET. B) Gráficos de barras con la abundancia relativa de las especies encontradas en ratones

littermates tratados con IMQ. Cada columna representa una muestra original. C) Representación de la frecuencia relativa de *P.distasonis*, *B.acidifaciens* y *A.muciniphila* en muestras fecales de ratones WT y B1KO tratados con IMQ crecidos como *single cage* o *littermates*. En el caso de *littermates*, se incluyen también ratones HET. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=6-12 ratones por grupo. LM: *littermates*, SC: *single cage*. C: Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

Estos niveles, comparables entre los ratones *littermates* de los tres genotipos, eran además similares a los observados en ratones B1KO *single cage* posteriormente al tratamiento con IMQ (Fig. 38A). En paralelo, se caracterizó la expresión de claudina-1 en el epitelio intestinal de los ratones *littermates* tras la inducción de la enfermedad, encontrándose que la presencia de una microbiota asociada al genotipo B1KO era suficiente para inducir en los ratones WT, B1KO y HET una expresión similar a la de los ratones B1KO *single cage* (Fig. 12C, 38B). Así, las micrografías ilustraron una distribución normal de esta proteína en la membrana de los enterocitos que, además, resultaba comparable entre los tres genotipos de ratones (Fig. 38B).

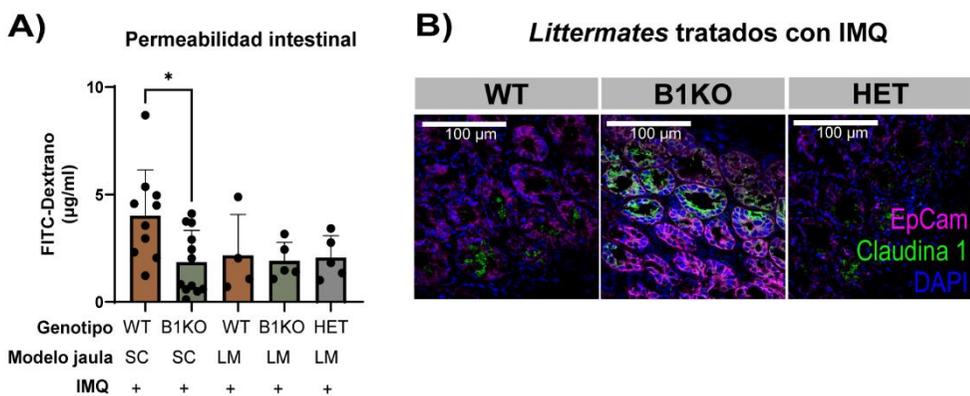


Figura 38. La presencia de una microbiota asociada a la deficiencia de *Bank1* en los ratones *littermates* induce una permeabilidad intestinal comparable a los ratones B1KO *single cage*. A) Cuantificación *in vivo* de la permeabilidad intestinal en ratones tratados con IMQ *single cage* y *littermates*. Los datos son representativos de dos experimentos independientes

La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

con n=5-10 ratones por grupo. Las gráficas representan el valor medio con SD. B) Tinción representativa del patrón de expresión de claudina-1 en cortes transversales del íleon distal realizada por microscopía confocal. Todas las imágenes fueron capturadas usando un objetivo Zeiss Plan-Apochromat 63X/1.40 NA en aceite de inmersión DIC M27 (apertura de *pinhole*= 1.0 AU). LM: *littermates*, SC: *single cage*. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

En los ratones *littermates* se evaluó también la respuesta celular y humoral IgA en condiciones basales y tras la aplicación del tratamiento de IMQ con el objetivo de analizar los efectos del fondo genético en la respuesta inmunitaria intestinal ante la normalización de la microbiota como fuente de variabilidad.

En estado estacionario se encontró que los ratones B1KO y HET *littermates* presentaban un reclutamiento significativamente inferior de células B totales a la lámina propia intestinal en comparación con sus homólogos WT *littermates* (Fig. 39A), emulando lo observado en estado estacionario en ratones WT y B1KO *single cage* (Fig. 8A). En estas mismas condiciones, sin embargo, las células B220⁻ IgA⁺, que en ratones *single cage* eran significativamente inferiores en WT en comparación con los B1KO (Fig. 9A), en los ratones *littermates* se encontraron en frecuencias comparables en los tres genotipos analizados (Fig. 39B). Tras el tratamiento con IMQ, las células B220⁻ IgA⁺ mostraron en los ratones *littermates* frecuencias comparables a los ratones *single cage* (Fig. 39C).

Siguiendo el flujo de análisis descrito en apartados anteriores, se caracterizó a continuación la respuesta IgA global y la dirigida concretamente hacia las bacterias fecales. Siguiendo el comportamiento encontrado entre los ratones WT y B1KO *single cage* tras el tratamiento con IMQ (Fig. 13F), los controles *single cage* de este modelo no presentaron diferencias significativas entre ambos genotipos en la concentración de IgA libre en el contenido fecal (Fig. 39D). Los ratones *littermates* con lupus, no obstante, presentaron niveles similares entre los tres genotipos, pero

significativamente menores que los hallados en los ratones B1KO *single cage* tras la inducción de la enfermedad (Fig. 39D). Respecto a la cobertura de IgA hacia las bacterias fecales, tanto los ratones *single cage* como aquellos criados como *littermates* presentaron niveles semejantes de cobertura (Fig. 39E).

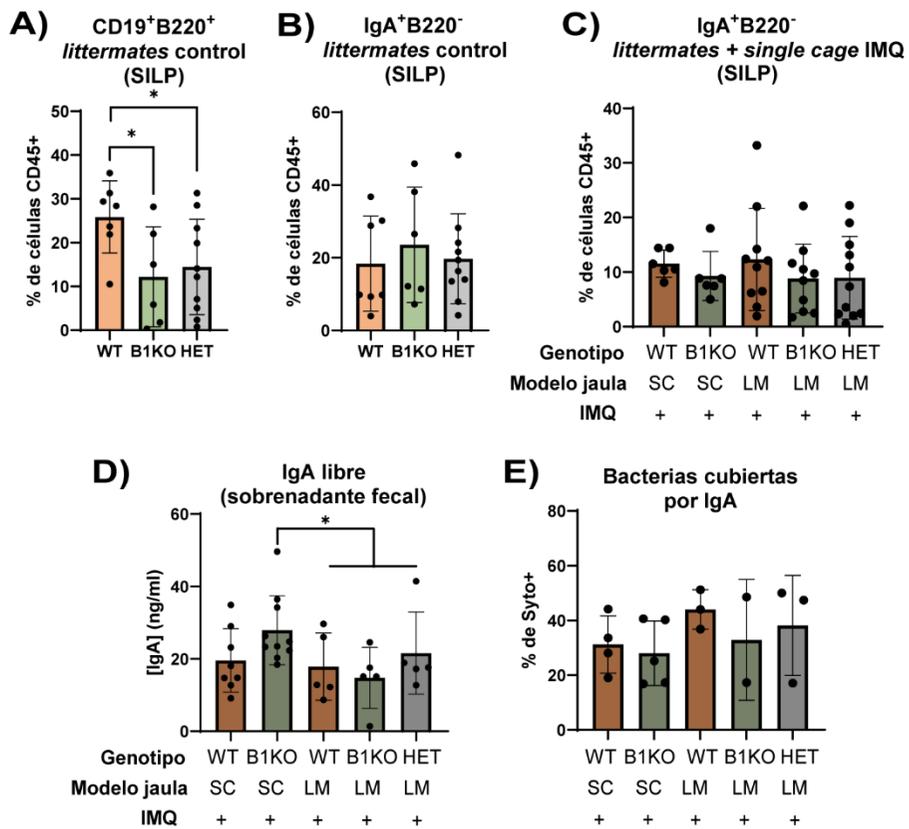


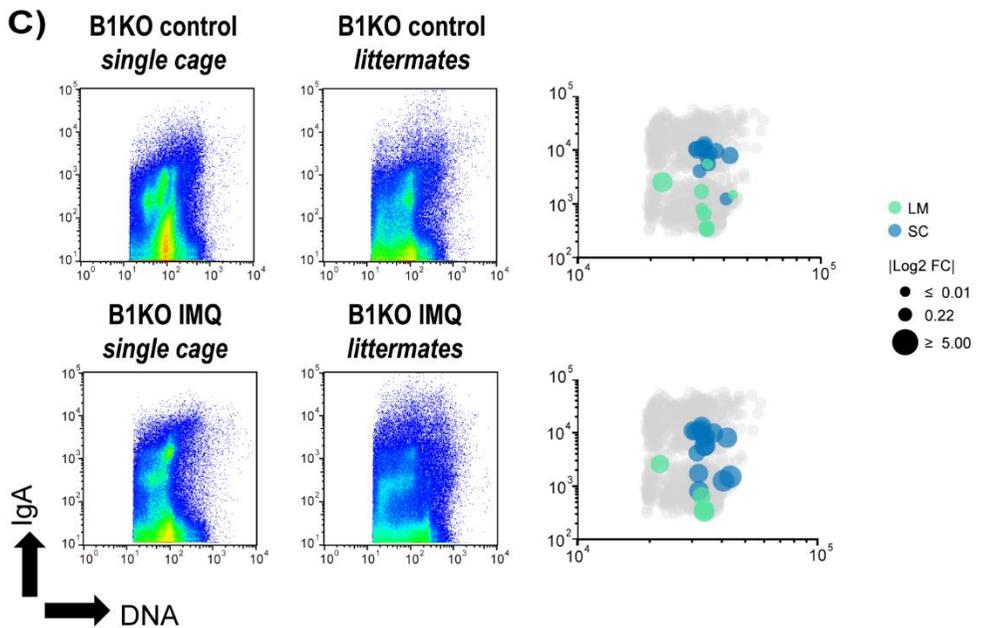
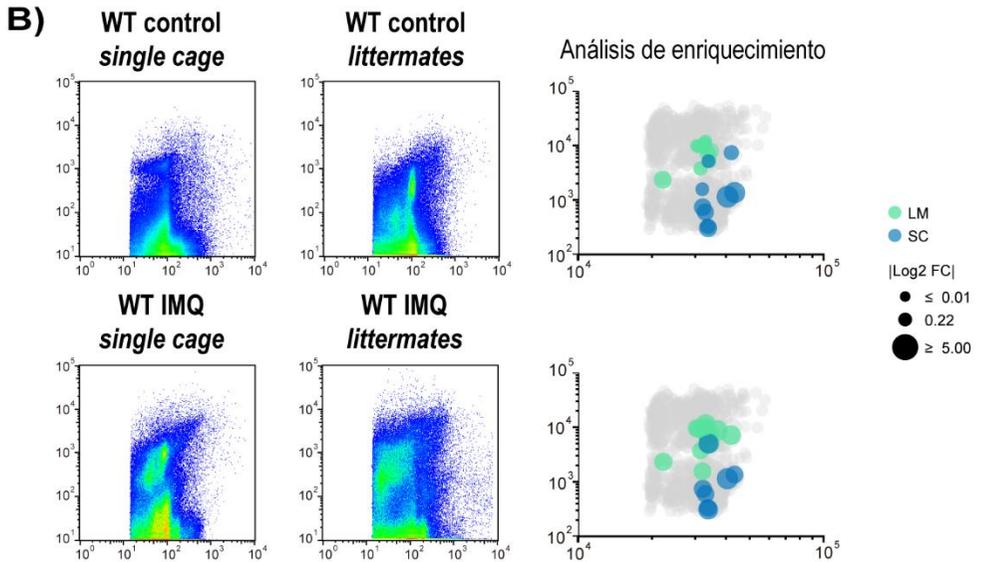
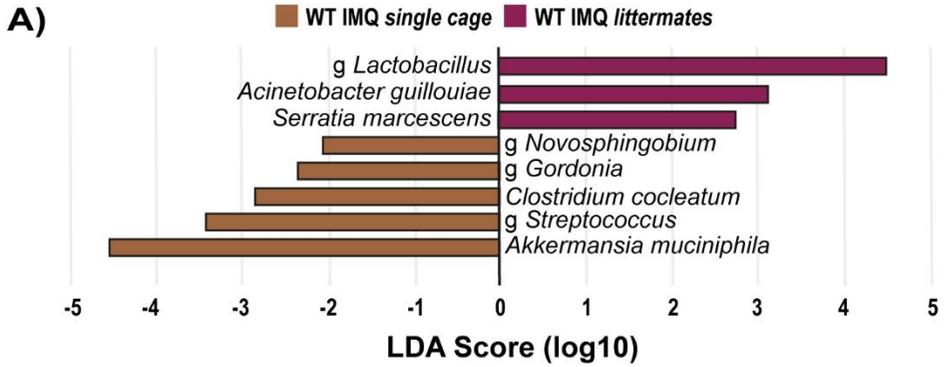
Figura 39. La respuesta celular IgA⁺ intestinal se iguala en ratones *littermates* con lupus. A) Caracterización de células B (caracterizadas como CD19⁺ B220⁺) en SILP de ratones *littermates*. B-C) Frecuencia de células B productoras de IgA B220⁻ en SILP. B) Representación en ratones *littermates* control y C) representación en ratones *single cage* y *littermates* tratados con IMQ. D-E) Análisis de la respuesta IgA intestinal mediante la cuantificación de la IgA libre en sobrenadantes fecales por ELISA (D) y el pegado de IgA hacia las bacterias fecales por citometría de flujo (G,I) en ratones tratados con IMQ. SILP: Lámina propia del intestino delgado, LM: *littermates*, SC: *single cage*. A-E) Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 semanas de edad. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=5-10 ratones por grupo. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. *p≤0.05; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

La microbiota generada por la ausencia de *Bank1* induce un papel protector en ratones con lupus.

Para el análisis exhaustivo de la respuesta inmunitaria intestinal hacia la microbiota fecal se procedió a la separación de las bacterias según su recubrimiento de IgA seguido de la secuenciación del ADN bacteriano (Fig. 14A). Esta caracterización permitió evaluar el poder de la composición de la microbiota en la respuesta IgA. La comparativa mediante LEfSe de las bacterias encontradas en la fracción positiva de ratones con lupus WT *single cage* y *littermates* identificó a *Serratia marcescens*, *Acinetobacter guillouiae* y especies del género *Lactobacillus* como los taxones diferenciales en los WT *littermates*. Por el contrario, los ratones WT *single cage* tratados con IMQ poseían de forma diferencial en su fracción IgA⁺ a *Clostridium cocleatum*, *Akkermansia muciniphila*, además de otras bacterias del género *Streptococcus* (Fig. 40A).

En paralelo, el análisis multiparamétrico a nivel de célula única en las bacterias de los ratones *littermates* con lupus demostró que las poblaciones con mayor variación entre los ratones WT *single cage* y WT *littermates* presentaban pegados diferenciales de IgA tanto en estado estacionario como tras el tratamiento con IMQ.

En ambas condiciones, la presencia de una microbiota asociada a BIKO en los ratones WT era capaz de inducir un enriquecimiento en las poblaciones IgA⁺, mientras que los WT *single cage* presentaban una mayor frecuencia de bacterias IgA⁻ de forma basal y con lupus (Fig. 40B). No obstante, la comparativa de ratones BIKO *single cage* y *littermates*, apuntó a un comportamiento opuesto en ambas condiciones (estado basal y estado de enfermedad). En ausencia de *Bank1*, los ratones criados como *littermates* presentaron un enriquecimiento en las bacterias IgA⁻, y aquellas bacterias con mayor cobertura de IgA aparecen con mayor frecuencia en ratones *single cage* (Fig. 40C).



La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

Figura 40. Los ratones WT littermates presentan una microbiota diferencial con los WT single cage. A) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de las especies encontradas en la fracción IgA+ de bacterias fecales de ratones WT *single cage* y WT *littermates* tratados con IMQ. B-C) Izquierda: gráficos de puntos representativos del pegado de IgA y el perfil de ADN entre ratones *single cage* y sus homólogos *littermates* en estado basal y con lupus. Derecha: representación de los valores medios de pegado de IgA y perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (*single cage* o *littermates*) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). B) Comparativa entre ratones WT y C) comparativa entre ratones B1KO. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=5-10 ratones por grupo.

Finalmente, el análisis del patrón de azúcares de superficie reveló que, en ratones *littermates*, la distribución de las bacterias que pegan ConA, PNA, WGA o STL era heterogénea en ambos genotipos, independientemente de si se medían en estado estacionario (Fig. 41) o tras el tratamiento con IMQ (Fig. 42). De forma especialmente llamativa, se encontró que la comparación del enriquecimiento en poblaciones que pegan todas las lectinas analizadas entre ratones WT *single cage* y ratones WT *littermates* emularon los resultados obtenidos al comparar los ratones WT *single cage* con los ratones B1KO *single cage* (Fig. 20, 21). Este comportamiento se observó entre los ratones WT *single cage* y *littermates* en condiciones basales (Fig. 43) y posteriormente al tratamiento con IMQ (Fig. 44). Además, dentro de las poblaciones generadas en el análisis del patrón de pegado de lectinas, aquellas que presentaron los cambios más notables entre los diferentes grupos del modelo de *littermates* y sus controles *single cage*, evolucionaron de una forma similar en los ratones que compartían la composición de la microbiota (Fig. 45).

La caracterización de la respuesta inmunitaria sistémica e intestinal en ratones *Bank1^{+/+}* tras la adquisición de una microbiota asociada al genotipo *Bank1^{-/-}* prueba que gran parte de las manifestaciones inmunológicas generadas tras la inducción del lupus puede ser modulada por la composición de la microbiota.

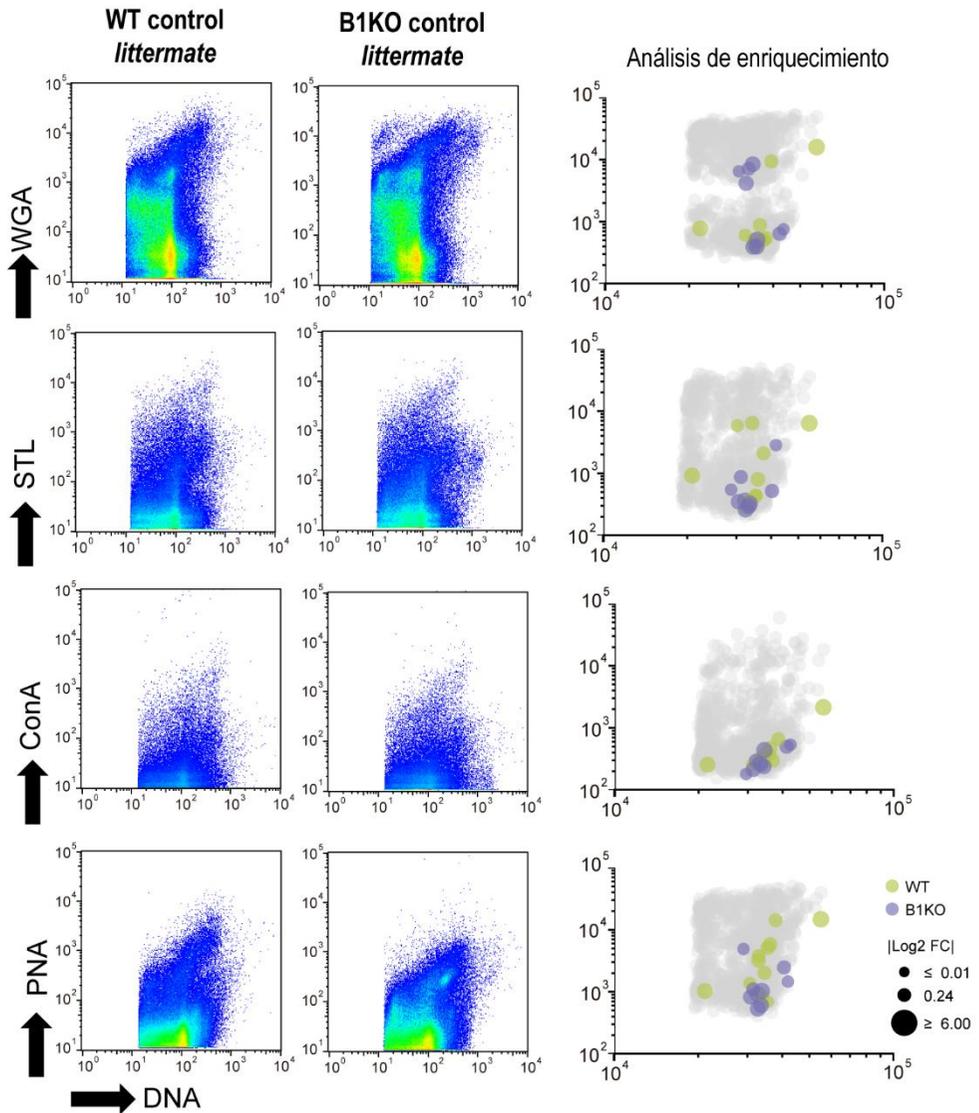


Figura 41. La normalización de la microbiota iguala el patrón de azúcares del ecosistema en estado estacionario. Izquierda: gráficos de puntos representativos del pegado de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT *littermates* y B1KO *littermates* control. Derecha: representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (WT o B1KO) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con $n=5-10$ ratones por grupo.

La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

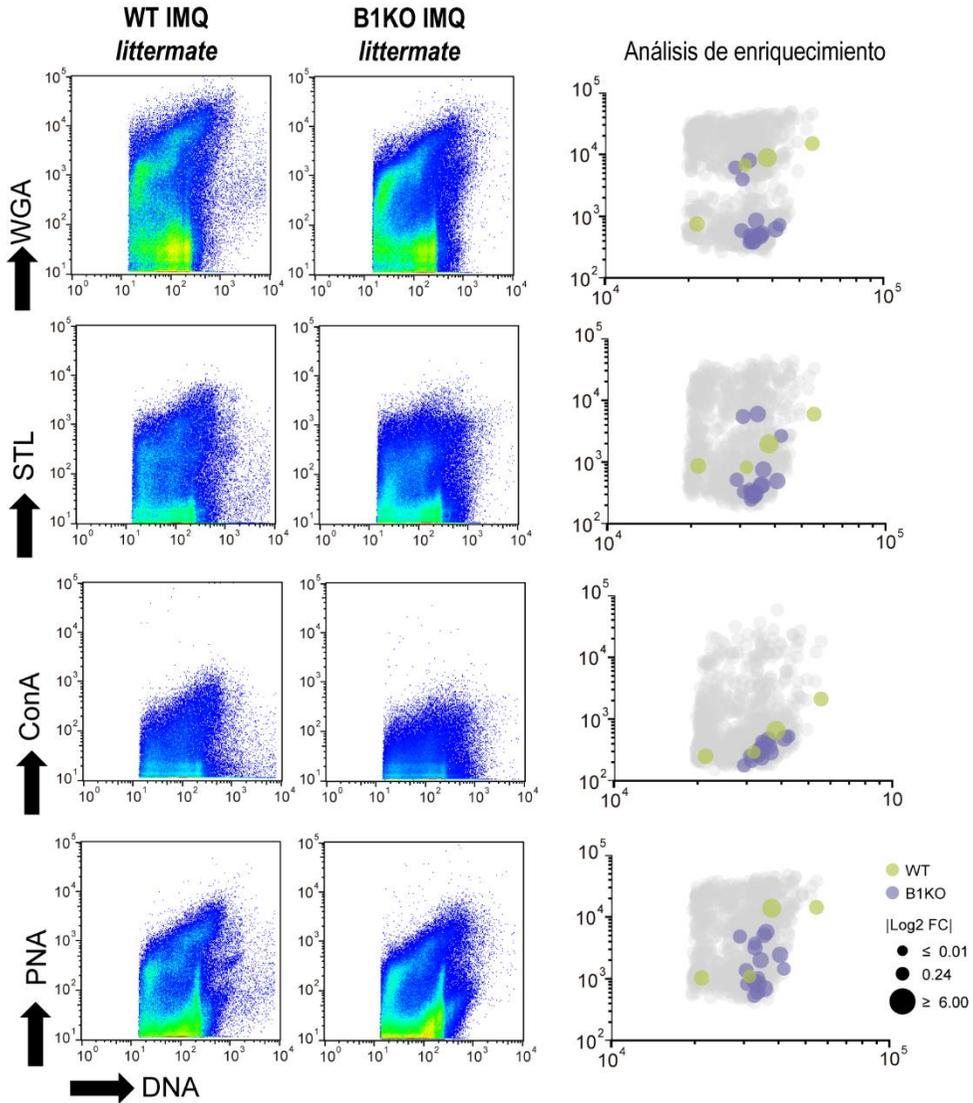


Figura 42. La normalización de la microbiota iguala el patrón de azúcares del ecosistema tras el tratamiento con IMQ. Izquierda: gráficos de puntos representativos del pegado de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT *littermates* y B1KO *littermates* tratados con IMQ. Derecha: representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (WT o B1KO) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=5-10 ratones por grupo.

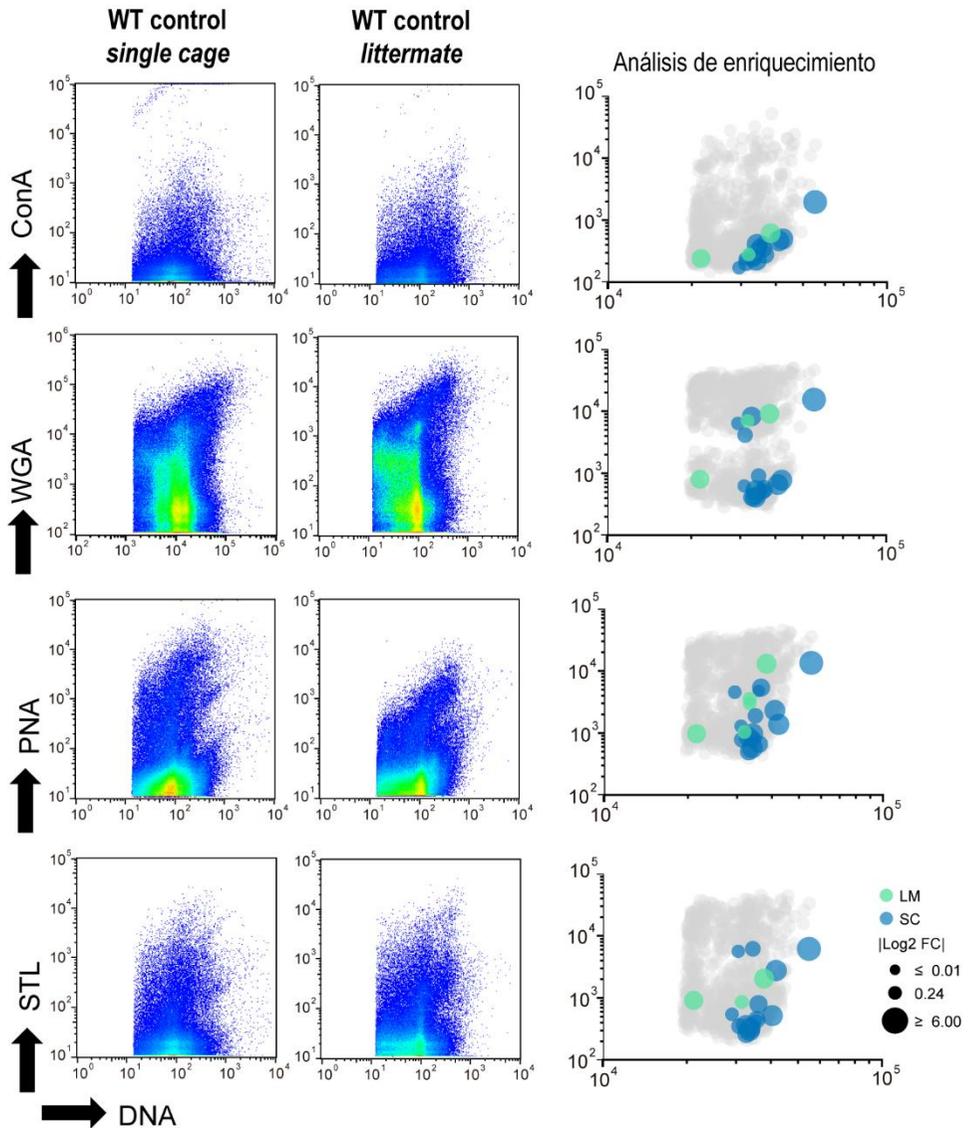


Figura 43. La microbiota asociada a $Bank1^{-/-}$ modifica el patrón de azúcares de superficie del ecosistema intestinal en estado estacionario. Izquierda: gráficos de puntos representativos del pegado de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT *single cage* y WT *littermates* control. Derecha: representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (*single cage* o *littermates*) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con $n=5-10$ ratones por grupo. LM: *littermates*, SC: *single cage*.

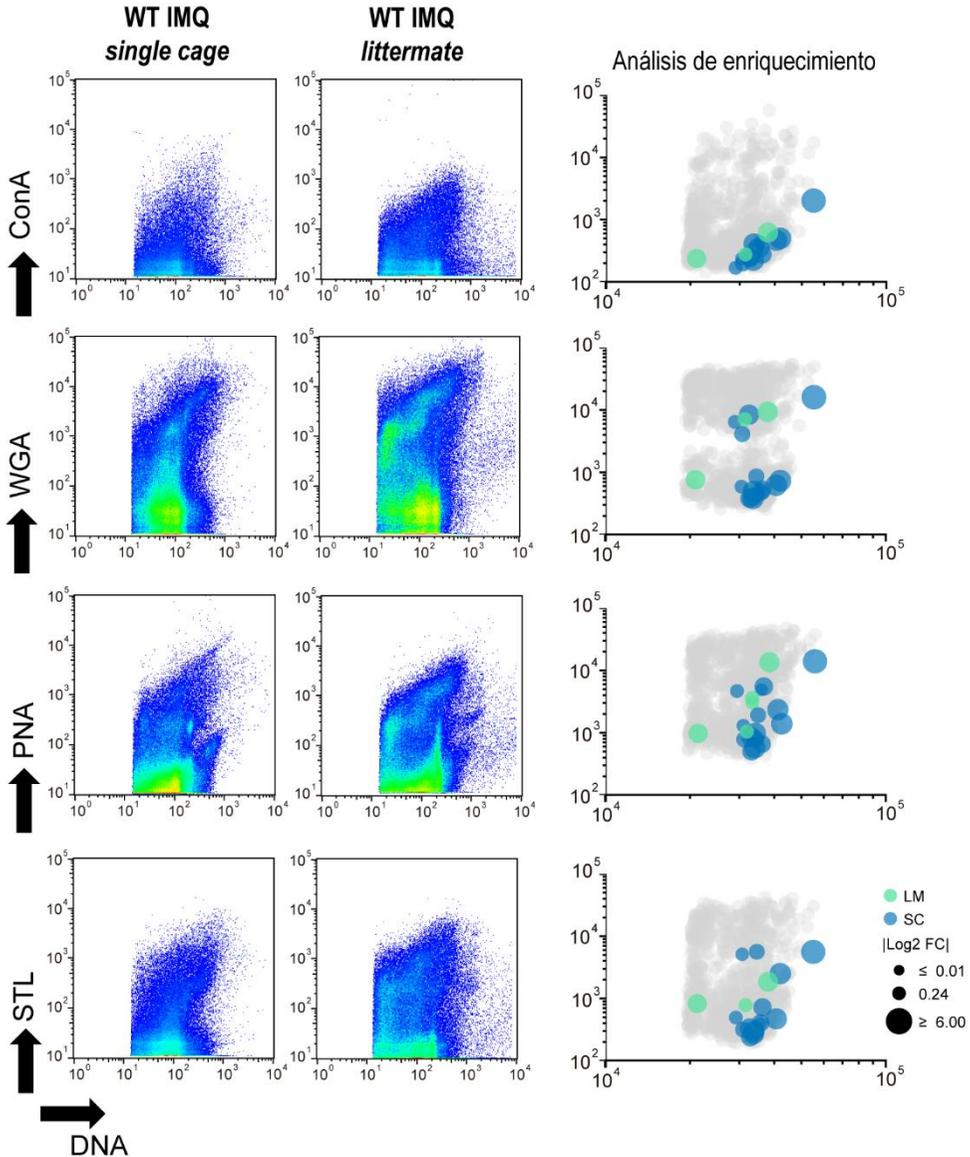


Figura 44. La microbiota asociada a *Bank1*^{-/-} modifica el patrón de azúcares de superficie del ecosistema intestinal en ratones con lupus. Izquierda: gráficos de puntos representativos del pegado de WGA, STL, PNA o ConA en ratones WT *single cage* y WT *littermates* tratados con IMQ. Derecha: representación de los valores medios de pegado de WGA, STL, PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones que mostraron más significancia en la variación de frecuencias entre ambos grupos. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido (*single cage* o *littermates*) y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con n=5-10 ratones por grupo. LM: *littermates*, SC: *single cage*.

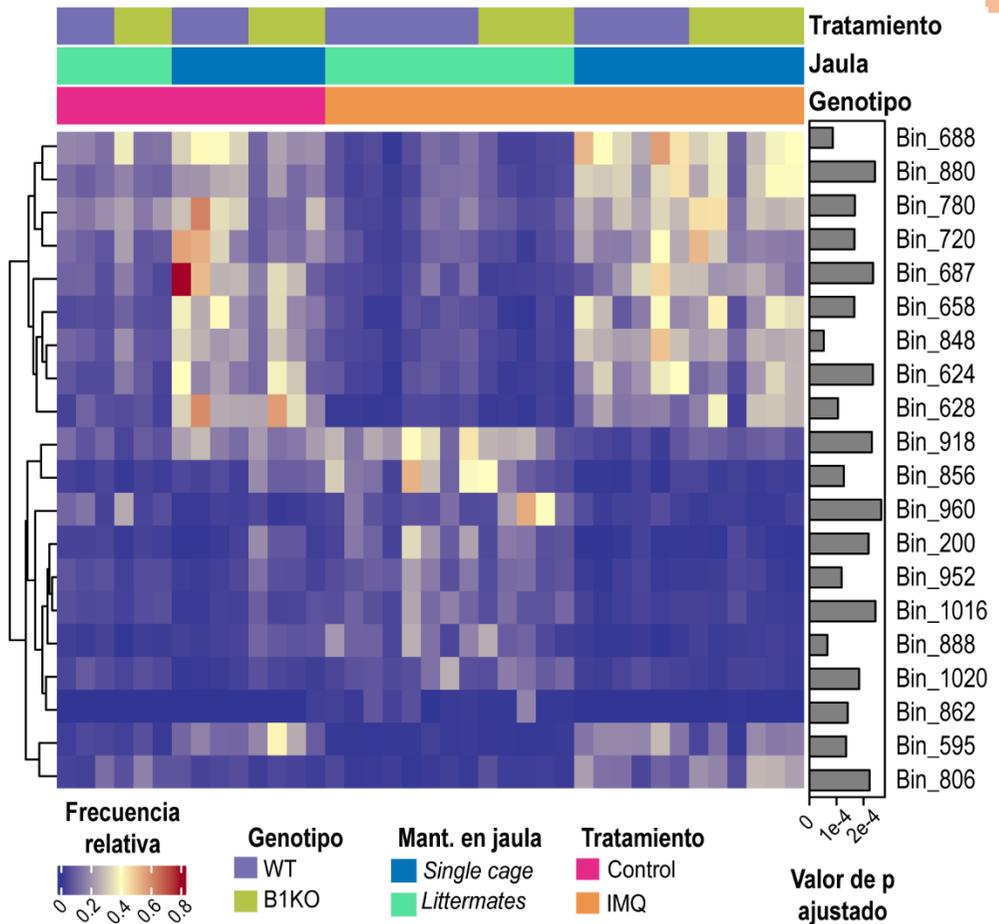


Figura 45. Mapa de calor de las frecuencias relativas de las poblaciones bacterianas seleccionadas para el modelo de *littermates*. Representación de la frecuencia relativa (gradiente azul-amarillo-rojo) de las poblaciones bacterianas filtradas y seleccionadas según el pegado de lectinas para los ratones WT y B1KO, controles y tratados con IMQ, criados en condiciones *single cage* o *littermates* (anotación de la parte superior). Cada columna representa una muestra individual. Test estadístico de Kruskal Wallis y ajuste del valor de p por el método de Bonferroni-Hochberg.

4.2. La administración externa de *Parabacteroides distasonis* induce una fenocopia del cuadro de lupus desarrollado en ratones B1KO.

Dado que *P. distasonis* fue una de las especies con mayor abundancia diferencial en el intestino de ratones B1KO tras el tratamiento con IMQ, se planteó la posibilidad de que el efecto inmunoregulador encontrado en los ratones WT *littermates*

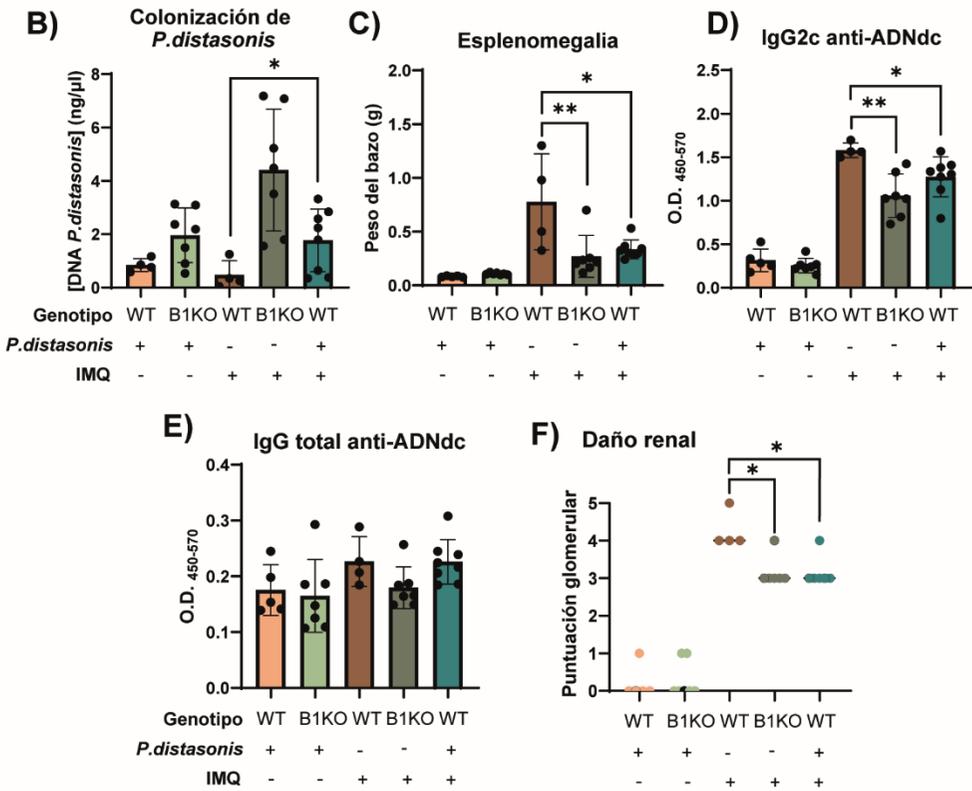
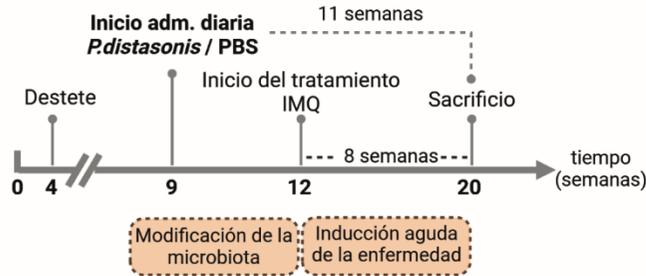
La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

portadores de la respuesta B1KO pudiera atribuirse a esta especie. Para probar esta hipótesis, se diseñó una cinética de administración por vía oral de *P. distasonis* que se mantuvo durante el tratamiento con IMQ (Fig. 46A). Además, se estableció como control un grupo de ratones tratados con IMQ que recibieron de forma oral la solución usada para la dilución de las bacterias (Fig. 46A).

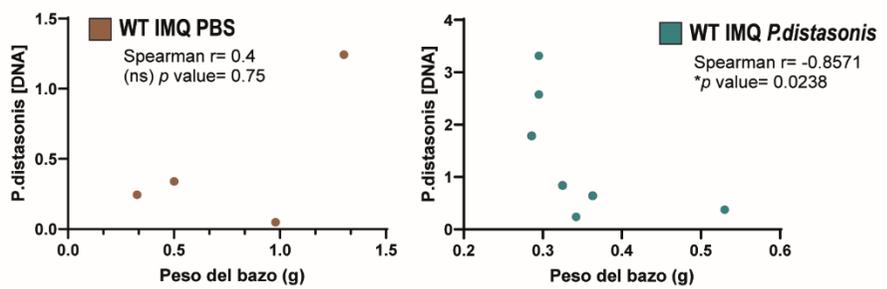
Tras el sacrificio de los ratones, se evaluó inicialmente la concentración de la bacteria en el contenido bacteriano fecal por qPCR. Esta técnica confirmó que los ratones B1KO poseen esta bacteria como parte de su microbiota natural en respuesta a la inflamación (ratones B1KO sin suplementación, con IMQ) (Fig. 46B). Además, se pudo comprobar que la suplementación mantenida en el tiempo de *P. distasonis* a ratones WT inducía un incremento significativo de la presencia de esta bacteria en comparación con ratones WT que recibieron PBS previamente y durante el tratamiento con IMQ (Fig. 46B).

La caracterización de la esplenomegalia, los niveles de autoanticuerpos anti-ADNdc y el daño renal desarrollados por estos ratones demostró, en primer lugar, que la administración externa de *P. distasonis* no inducía, *per se*, ningún síntoma de autoinmunidad, probando la inocuidad de esta suplementación (Fig. 46C-F). En ratones tratados con IMQ, por su parte, se observó que la presencia de *P. distasonis* en el intestino de ratones WT provoca una disminución significativa de la esplenomegalia en comparación con ratones WT tratados con IMQ que recibieron PBS, alcanzando niveles similares a los encontrados en ratones B1KO (Fig. 46C). Esta tendencia de mejora en ratones suplementados con *P. distasonis* y tratados con IMQ se observó también en el análisis de los autoanticuerpos anti-ADNdc IgG2c y el daño renal (Fig. 46D, F). Los niveles de IgG total con reactividad hacia el ADNdc, sin embargo, se mantuvieron invariables en comparación con los ratones WT que recibieron PBS y fueron tratados con IMQ (Fig. 46E).

A) Cinética de desarrollo de lupus en el modelo de IMQ con suplementación de *P.distasonis*



G) Concentración fecal de *P.distasonis* vs esplenomegalia



La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

Figura 46. Los ratones WT suplementados con *P.distasonis* presentan manifestaciones menos severas de lupus. A) Descripción de la adaptación del modelo de IMQ con suplementación de PBS o *P.distasonis*. Se incluyeron ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) control suplementados con *P.distasonis*, ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) tratados con IMQ suplementados con PBS, y ratones WT (n=8) suplementados con *P.distasonis* y tratados con IMQ. B) Análisis de la colonización de *P.distasonis* en el intestino de los ratones incluidos en este modelo a las 20 semanas de edad por qPCR. C) Medida de esplenomegalia caracterizada por la masa del bazo. D-E) Niveles de autoanticuerpos de isotipo IgG2c(D) e IgG total (E) anti ADNdc en suero medidos por ELISA. F) Estudio del daño renal mediante un sistema de puntuación glomerular basado en el análisis ciego de las micrografías ópticas renales (0: ningún nivel de daño, 5: daño renal elevado). G) Correlación entre la concentración de *P.distasonis* en las heces y la esplenomegalia en ratones WT tratados con IMQ suplementados con PBS (izquierda) y WT tratados con IMQ suplementados con *P.distasonis* (derecha). B-E: Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 semanas de edad. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. G: Test estadístico de correlación de Spearman (r). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

Adicionalmente, y para reforzar la asociación entre la colonización intestinal por *P. distasonis* y la mejora de las manifestaciones del lupus, se realizó un análisis de correlación entre la abundancia de esta bacteria en el contenido fecal y la esplenomegalia encontrada. En los ratones WT con lupus con lupus que recibieron PBS, no se encontró ninguna asociación (Fig. 46G), mientras que en ratones WT que recibieron *P. distasonis* se encontró una correlación inversa y significativa entre la concentración de la bacteria y el grado de inflamación del bazo (Fig. 46G).

Respecto a la influencia de *P. distasonis* en la actividad celular inmunitaria, se vio en primer lugar que, en estado estacionario, la suplementación inducía en ratones WT una frecuencia de células B de CG significativamente mayor en comparación con sus homólogos B1KO no tratados con IMQ, pero sí con la bacteria (Fig. 47A). Tras la inducción de lupus, los ratones WT suplementados con *P. distasonis* presentaron una disminución significativa en la frecuencia de células B de GC en comparación con los ratones WT tratados con IMQ pero suplementados con PBS. Nuevamente, los niveles de GC tras el tratamiento mostrados por los ratones WT que recibieron la bacteria fueron comparables a los encontrados en los ratones B1KO (Fig. 47A).

Por otro lado, en los niveles de células B220⁻ IgA⁺ en el tejido intestinal, se encontró que todos los animales de este modelo presentaron frecuencias comparables, independientemente de si habían recibido la bacteria o PBS, y de si estaban tratados o no (Fig. 47B). En las PP, la suplementación con *P. distasonis* indujo una disminución significativa de estas células en los ratones B1KO no tratados con IMQ, pero no se encontraron diferencias significativas entre ratones suplementados y no suplementados tras la inducción de lupus (Fig. 47C). Sobre la secreción de IgA al lumen intestinal y su pegado en bacterias fecales, todos los ratones de este grupo (IMQ+/- y uplementados con *P. distasonis*/PBS) mostraron concentraciones comparables de IgA libre y frecuencias de bacterias totales cubiertas por IgA (Fig. 47D, E).

A pesar de no encontrarse diferencias significativas en la respuesta humoral de IgA, la suplementación con *P. distasonis* en los ratones WT tratados con IMQ sí tuvo un efecto en la regulación de la expresión de las TJ, un fenómeno que, en ratones WT y B1KO *single cage*, no suplementados con ninguna bacteria, aparece alterado entre ambos genotipos (Fig. 12C). Con este modelo se pudo ver que la administración exógena de *P. distasonis* y su colonización intestinal induce, tras el tratamiento con IMQ, un cambio en la expresión de Claudina-1 desde el interior del citoplasma hasta la membrana de las células epiteliales que conforman la barrera intestinal (Fig. 47F), presentando una estructura muy similar a la encontrada en ratones B1KO tratados con IMQ.

Como última parte de la evaluación de los efectos que *P. distasonis* puede generar cuando se suministra como probiótico se analizó y comparó la composición de la microbiota presente en los diferentes grupos de este modelo.

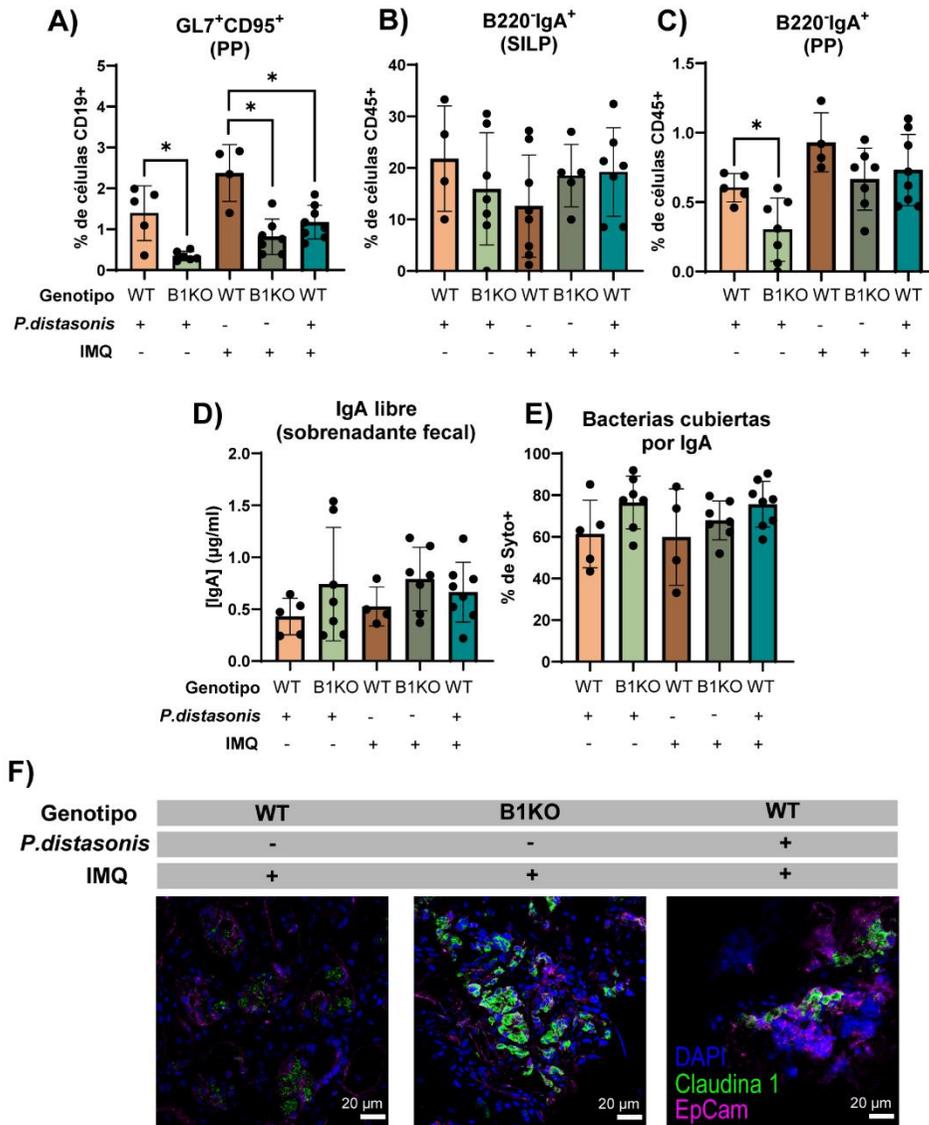


Figura 47. La suplementación con *P.distasonis* a ratones WT emula el fenotipo B1KO de CGs y permeabilidad intestinal. A) Representación de la frecuencia de células B de centro germinal (GL7+ CD95+) en las placas de Peyer de ratones de este modelo. B-C) Frecuencia de células B productoras de IgA B220- en SILP (B) y PP (C) caracterizada por citometría de flujo. D-E) Análisis de la respuesta IgA intestinal mediante la cuantificación de la IgA libre en sobrenadantes fecales por ELISA (D) y el pegado de IgA hacia las bacterias fecales por citometría de flujo (E). F) Tinción representativa del patrón de expresión de claudina-1 (verde) en cortes transversales del íleon distal de ratones tratados con IMQ realizada por microscopía confocal. Todas las imágenes fueron capturadas usando un objetivo Zeiss Plan-Apochromat 63X/1.40 NA en aceite de inmersión DIC M27 (apertura de *pinhole*= 1.0 AU). A-E) Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 semanas de edad. Se incluyeron ratones

WT (n=5) y B1KO (n=7) control suplementados con *P.distasonis*, ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) tratados con IMQ suplementados con PBS, y ratones WT (n=8) suplementados con *P.distasonis* y tratados con IMQ. PP: placas de Peyer, SILP: Lámina propia del intestino delgado. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

Como era de esperar, la suplementación con *P. distasonis* indujo una modificación del ecosistema intestinal. La caracterización de la alfa diversidad indicó niveles comparables de riqueza y uniformidad entre los grupos, con ausencia de significación estadística en el índice de Pielou ($p=0.49$) y la diversidad filogenética de Faith ($p=0.073$) (Fig. 48A). El estudio de la beta diversidad entre los grupos generó diferencias significativas entre los grupos ($p=0.014$), pero la representación visual de los ecosistemas por un PCA no permitió la separación espacial clara entre los grupos (Fig. 48B).

De forma concomitante a la proliferación de *P. distasonis*, otro de los rasgos encontrados en la microbiota de los ratones B1KO *single cage* tras el tratamiento con IMQ fue la disminución de la frecuencia de *A. muciniphila*. Para determinar si este cambio en el ecosistema está relacionado con el sobrecrecimiento de *P. distasonis* se analizó su abundancia en la microbiota de ratones tratados con IMQ, encontrándose diferencias significativas en la frecuencia de esta bacteria entre ratones WT tratados con IMQ, suplementados con PBS o con *P. distasonis* (Fig. 48C). Además, el análisis LEfSe ilustró que los ratones WT tratados con IMQ y suplementados con *P. distasonis* presentaron un enriquecimiento de los géneros *Sutterella*, *Ruminococcus* y *Lactobacillus*, y una reducción en la familia *Erysipelotrichaceae* y las especies *Clostridium methylpentosum* y *A. muciniphila* (Fig. 48D) en comparación con sus homólogos WT que recibieron PBS.

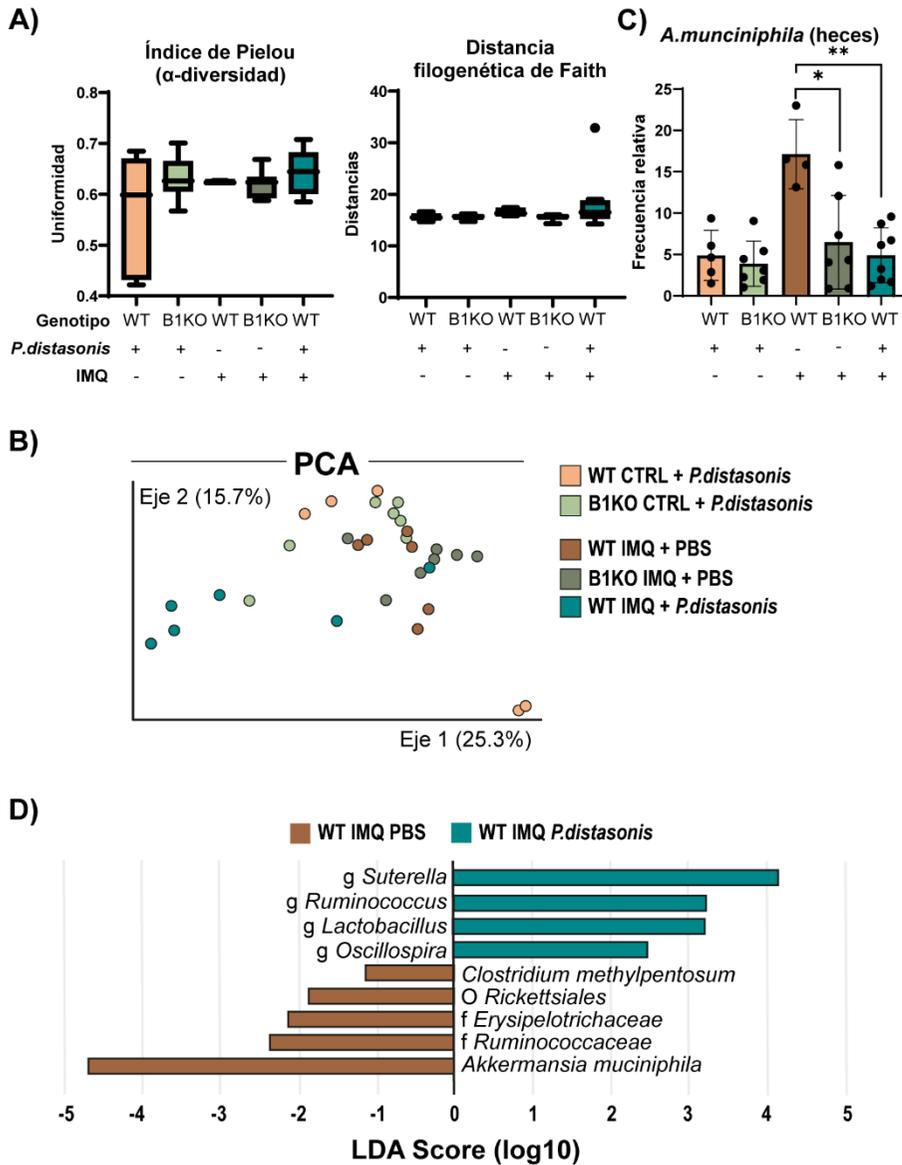


Figura 48. Los ratones WT suplementados con *P.distasonis* experimentan cambios en su microbiota. A) Representación de la alfa diversidad (distancia filogenética de Faith e índice de Pielou o Uniformidad) entre grupos. B) Representación de la beta diversidad por PCA. C) Representación de la frecuencia relativa de *A.muciniphila* en heces. D) Análisis de discriminación lineal con tamaño de efecto de los ecosistemas bacterianos intestinales entre ratones WT tratados con IMQ suplementados con PBS y ratones WT tratados con IMQ suplementados con *P.distasonis*. Se incluyeron ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) control suplementados con *P.distasonis*, ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) tratados con IMQ suplementados con PBS, y ratones WT (n=8) suplementados

con *P.distasonis* y tratados con IMQ. A,C: Las gráficas representan el valor medio con SD. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

A pesar de que el porcentaje global de bacterias cubiertas por IgA no variara entre los ratones WT tratados con IMQ suplementados con PBS o con *P. distasonis*, el análisis multiparamétrico a nivel de célula única indicó que las poblaciones bacterianas mostrando las mayores variaciones en frecuencia entre ambos grupos presentaban distintos patrones de cobertura. De esta forma, los ratones WT tratados con IMQ y suplementados con *P. distasonis* presentaron un enriquecimiento en las poblaciones con mayor pegado de IgA sobre los ratones WT que recibieron el IMQ y PBS (Fig. 49). Esta tendencia emuló lo observado al comparar la respuesta IgA tras la inducción de lupus entre ratones WT que recibieron PBS frente a los B1KO (Fig. 49).

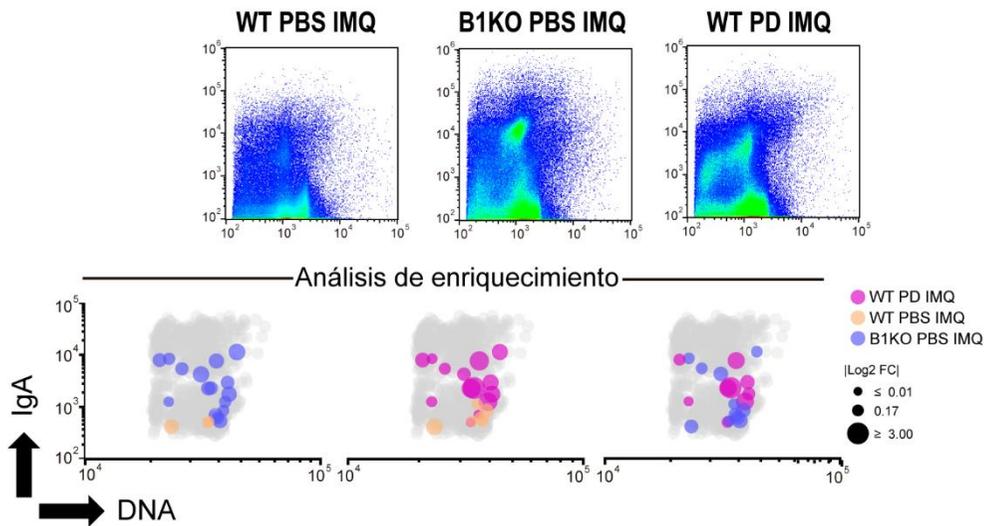


Figura 49. Cobertura de IgA y el perfil de ADN de las poblaciones bacterianas con las mayores variaciones de frecuencia entre ratones tratados con IMQ del modelo de suplementación con PBS/*P.distasonis*. Gráficos de puntos representativos de la cobertura de IgA y el perfil de DNA en ratones tratados con IMQ. Debajo de los gráficos de puntos se representan los valores medios de pegado de IgA y de ADN de las poblaciones filtradas y seleccionadas, divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT suplementados con PBS vs B1KO suplementados con PBS, WT suplementados con *P.distasonis* vs WT suplementados con PBS y B1KO suplementados con PBS vs WT suplementados con *P.distasonis*. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y

La microbiota generada por la ausencia de *Bank1* induce un papel protector en ratones con lupus.

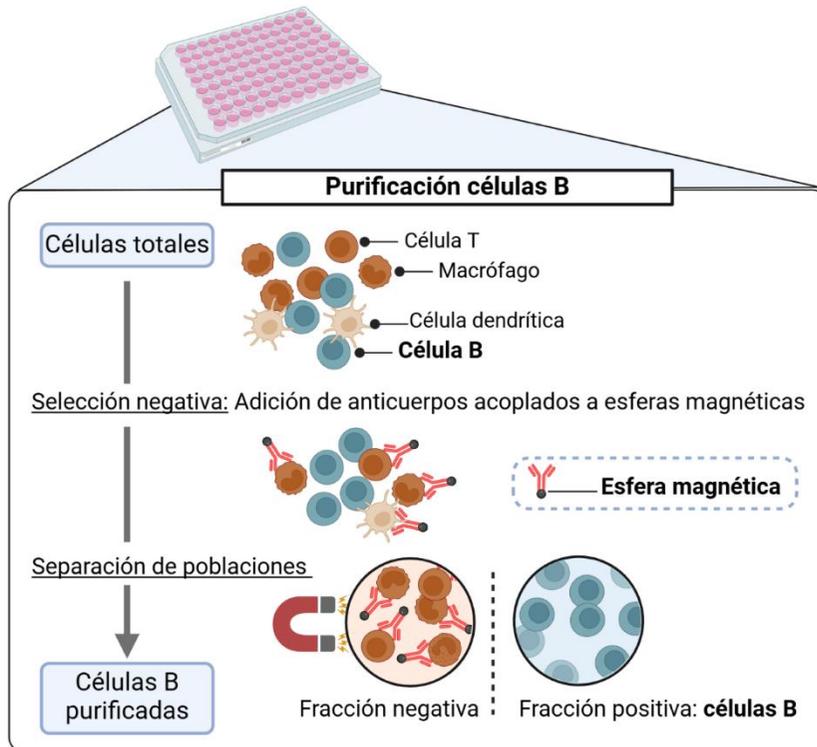
el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Se incluyeron ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) tratados con IMQ suplementados con PBS, y ratones WT (n=8) suplementados con *P.distasonis* y tratados con IMQ. PD: *P.distasonis*

Estos resultados parecieron indicar la implicación de *P. distasonis* en la estimulación de una respuesta IgA. Esta teoría se probó mediante la estimulación de células B *naïve* con bacterias *P. distasonis* inactivadas, y la medida de la diferenciación de estas células hacia un fenotipo de células plasmáticas productoras de IgA (Fig. 50A). Asimismo, se comparó la respuesta inducida en células purificadas de las PP o del bazo de ratones WT o B1KO no tratados con IMQ ni sometidos a ningún tipo de suplementación. En ausencia de *Bank1* se encontró una menor frecuencia de células B IgA⁺ en comparación con los niveles observados en las células WT solo en células B aisladas de las PP, mientras que el cocultivo de células B provenientes del bazo no mostró diferencias entre ratones B1KO y WT (Fig. 50B).

En relación a la composición de azúcares de las bacterias intestinales tras la inducción de lupus, las poblaciones bacterianas con pegado de STL y WGA aparecieron enriquecidas en los ratones WT suplementados con *P. distasonis* y en los ratones B1KO sobre los ratones WT que recibieron PBS (Fig. 51). El pegado de PNA y ConA se mantuvo heterogéneo en todos los grupos, sin un enriquecimiento marcado en ninguno de ellos (Fig. 52).

Teniendo en cuenta la comparativa inmunitaria y de la microbiota realizada entre ratones WT suplementados con *P. distasonis* y los que recibieron PBS, se concluyó que la presencia de esta bacteria en la microbiota fecal ejerce un papel inmunomodulador capaz de alterar la respuesta inmunitaria local del intestino. Estos cambios se traducen, de forma global, en una mejora de la sintomatología inducida por el tratamiento con IMQ, sin necesidad de modificar el fondo genético de los animales.

A)



B)

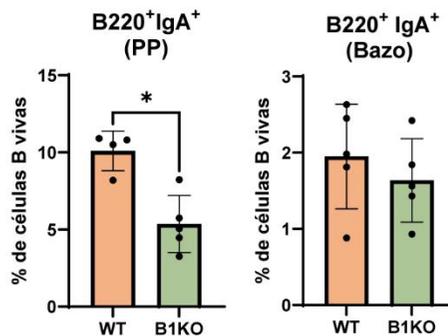
— Estimulación con *P. distasonis* —

Figura 50. Las células B intestinales deficientes para *Bank1* poseen una mayor capacidad de diferenciación hacia células plasmáticas secretoras de IgA. A) Ilustración del proceso de purificación de células B *naïve* mediante selección negativa. B) Frecuencia de células B220⁺ IgA⁺ tras la estimulación de células B nave purificadas de PP o el bazo de ratones WT y B1KO durante 48 horas con *P. distasonis*. PP: placas de Peyer. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. * $p \leq 0.05$; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

La microbiota generada por la ausencia de Bank1 induce un papel protector en ratones con lupus.

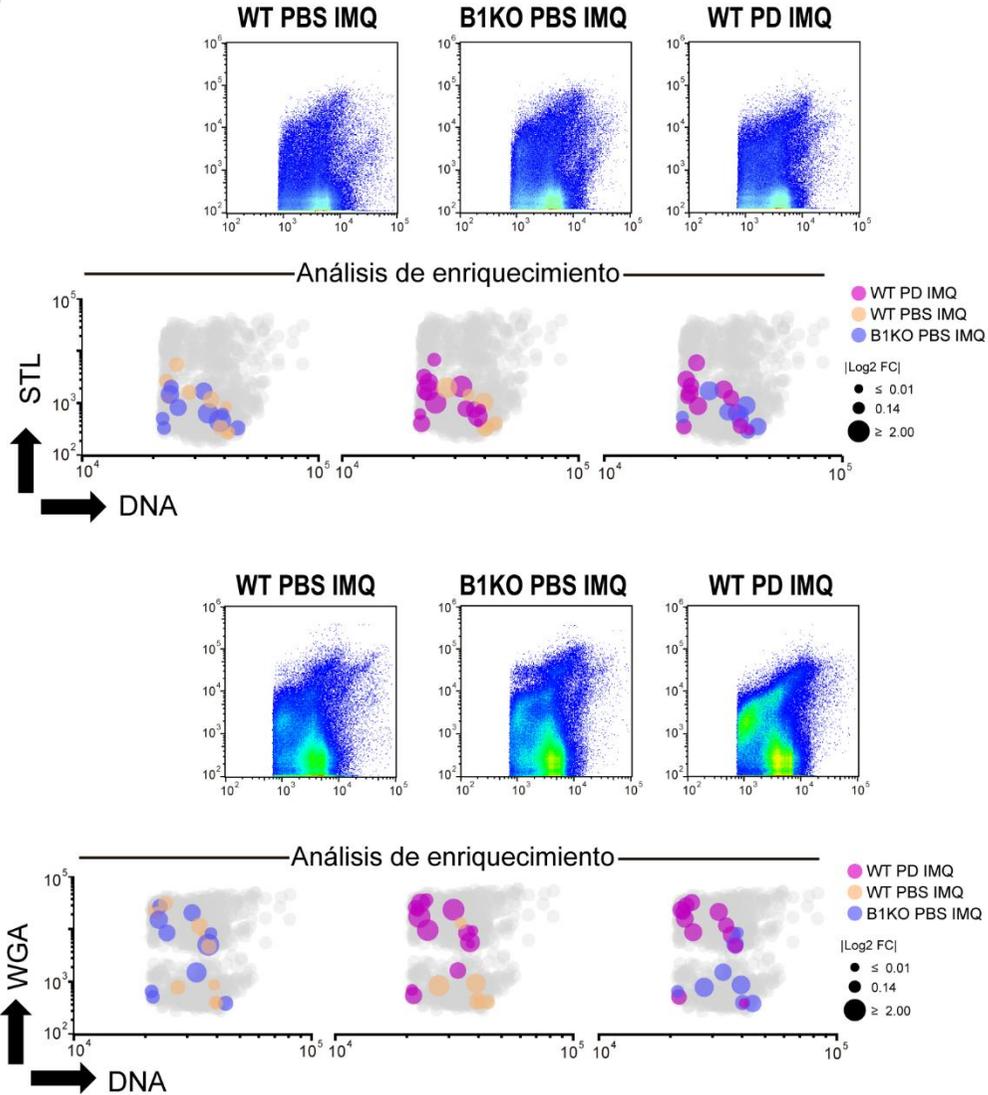


Figura 51. Pegado por STL o WGA y el perfil de ADN de las poblaciones bacterianas con las mayores variaciones de frecuencia entre ratones tratados con IMQ del modelo de suplementación con PBS/*P.distasonis*. Gráficos de puntos representativos del pegado de STL o WGA y el perfil de ADN en ratones tratados con IMQ. Debajo de los gráficos de puntos se representan los valores medios del pegado de STL o WGA y de ADN de las poblaciones filtradas y seleccionadas, divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT suplementados con PBS vs B1KO suplementados con PBS, WT suplementados con *P.distasonis* vs WT suplementados con PBS y B1KO suplementados con PBS vs WT suplementados con *P.distasonis*. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Se incluyeron ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) tratados con IMQ suplementados con PBS, y ratones WT (n=8) suplementados con *P.distasonis* y tratados con IMQ. PD: *P.distasonis*

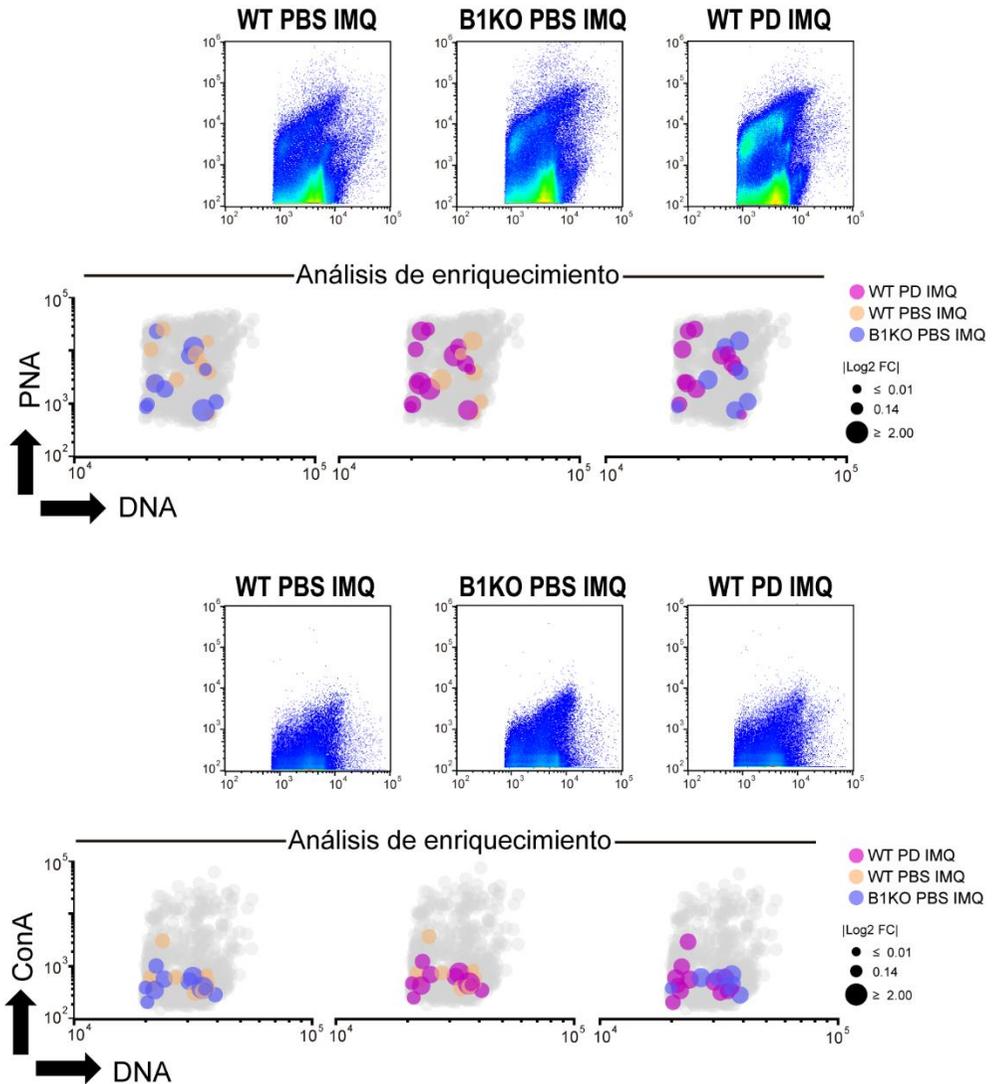


Figura 52. Pegado por PNA o ConA y el perfil de ADN de las poblaciones bacterianas con las mayores variaciones de frecuencia entre ratones tratados con IMQ del modelo de suplementación con PBS/*P.distasonis*. Gráficos de puntos representativos del pegado de PNA o ConA y el perfil de ADN en ratones tratados con IMQ. Debajo de los gráficos de puntos se representan los valores medios del pegado de PNA o ConA y de ADN de las poblaciones filtradas y seleccionadas, divididas en tres gráficos que muestran los análisis de enriquecimiento por parejas entre ratones WT suplementados con PBS vs B1KO suplementados con PBS, WT suplementados con *P.distasonis* vs WT suplementados con PBS y B1KO suplementados con PBS vs WT suplementados con *P.distasonis*. El código de color indica el grupo en el que se ha enriquecido en cada comparación y el diámetro, la magnitud del cambio relativo en valor absoluto (*fold change*). Se incluyeron ratones WT (n=5) y B1KO (n=7) tratados con IMQ suplementados con PBS, y ratones WT (n=8) suplementados con *P.distasonis* y tratados con IMQ. PD: *P.distasonis*.

La microbiota protectora asociada a la deficiencia de *Bank1* induce la diferenciación de células B productoras de IL-10.

5. La microbiota protectora asociada a la deficiencia de *Bank1* induce la diferenciación de células B productoras de IL-10.

Para finalizar el proyecto expuesto en esta tesis se quiso investigar el mecanismo mediador de la mejora de los síntomas del lupus por la microbiota intestinal. Para ello, se analizaron las células B productoras de IL-10, las cuales pueden ejercer funciones reguladores que faciliten la regulación inmunológica y disminuir la gravedad de las manifestaciones del lupus en los dos modelos mediados por TLR7.

5.1. Las células B intestinales de ratones *Bank1*^{-/-} tienen una mayor capacidad de diferenciarse hacia potenciales células B reguladoras.

El análisis de las frecuencias de células B IL-10⁺ en los dos modelos mostró que los ratones *Bank1*^{-/-} con lupus presentaban niveles significativamente superiores de estas células en sus PP y mLN en comparación con sus homólogos *Bank1*^{+/+} (ratones WT tratados con IMQ en el caso del modelo agudo y ratones TLR7Tg en el espontáneo) (Fig. 53A). Sin embargo, estas células se encontraron en niveles similares en los bazo y lámina propia de ratones WT y B1KO tratados con IMQ (Fig. 53B). De forma interesante, la respuesta IL-10 por parte de la población de células T de las PP no mostró diferencias significativas entre ratones con lupus *Bank1*^{+/+} y *Bank1*^{-/-} en ninguno de los dos modelos (Fig. 53C).

La microbiota se ha reportado en otros modelos de experimentación como un potente y directo inductor de un fenotipo regulador en células B intestinales³⁰⁶. Dado que *B. acidifaciens* y *P. distasonis* fueron las bacterias con una mayor magnitud de abundancia diferencial en ratones *Bank1*^{-/-} con lupus (Fig. 26D y 27B), se examinó la capacidad intrínseca de las células B *naïve* B1KO y WT de diferenciarse y sintetizar IL-10 en respuesta al estímulo con una u otra bacteria *ex vivo*. Esta respuesta se midió en

PP, mLN y bazo. Las diferencias más notables de este experimento se encontraron en las PP, donde ambas bacterias indujeron en las células *Bank1*^{-/-} una mayor diferenciación hacia un fenotipo IL-10⁺ en comparación con las células B WT (Fig. 53D, izquierda). En los mLN, solo *P. distasonis* fue capaz de inducir una respuesta diferencial entre células, encontrándose nuevamente una mayor producción de IL-10 por parte de las células B B1KO (Fig. 53D, centro). En el bazo, no obstante, no se observaron diferencias en la capacidad de diferenciación hacia un fenotipo secretor de IL-10 entre células B WT y B1KO con ninguna de las dos especies analizadas (Fig. 53D, derecha).

Estos resultados ilustran que la microbiota asociada al fondo genético *Bank1*^{-/-} posee capacidades inmunomoduladoras que potencian la síntesis de células B secretoras de IL-10.

5.2. *Parabacteroides distasonis* actúa como un potente inductor de células B productoras de IL-10 *in vivo*.

Dada la alta asociación entre la composición de la microbiota y la penetrancia de la enfermedad inducida por IMQ encontrada en este trabajo, se evaluó a continuación el impacto de la composición de las bacterias intestinales en la inducción de células B productoras de IL-10 *in vivo*. Considerando que las PP son las zonas de más íntimo contacto entre las células B y las bacterias intestinales, y ante la ausencia de diferencias significativas en los niveles de células B IL-10⁺ en la lámina propia, en los análisis posteriores solo se caracterizaron las células B productoras de IL-10 en las PP.

En los ratones *littermates* tratados con IMQ se encontró que el establecimiento de una microbiota asociada al genotipo B1KO era capaz de inducir en las PP de todos los ratones niveles de células B secretoras de IL-10 comparables entre los diferentes genotipos y similar a la encontrada en ratones B1KO en condiciones *single cage* (Fig. 54A).

La microbiota protectora asociada a la deficiencia de Bank1 induce la diferenciación de células B productoras de IL-10.

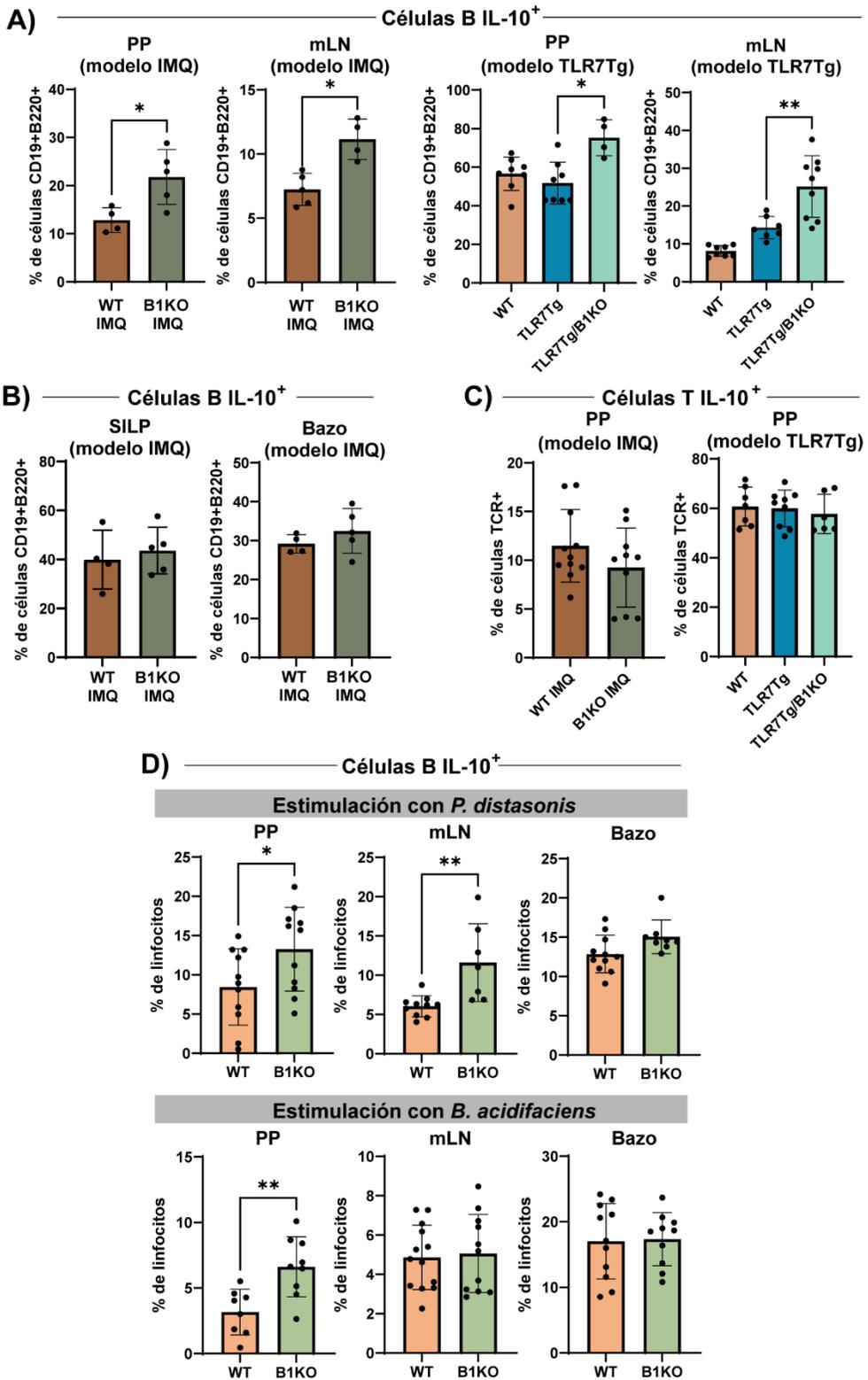


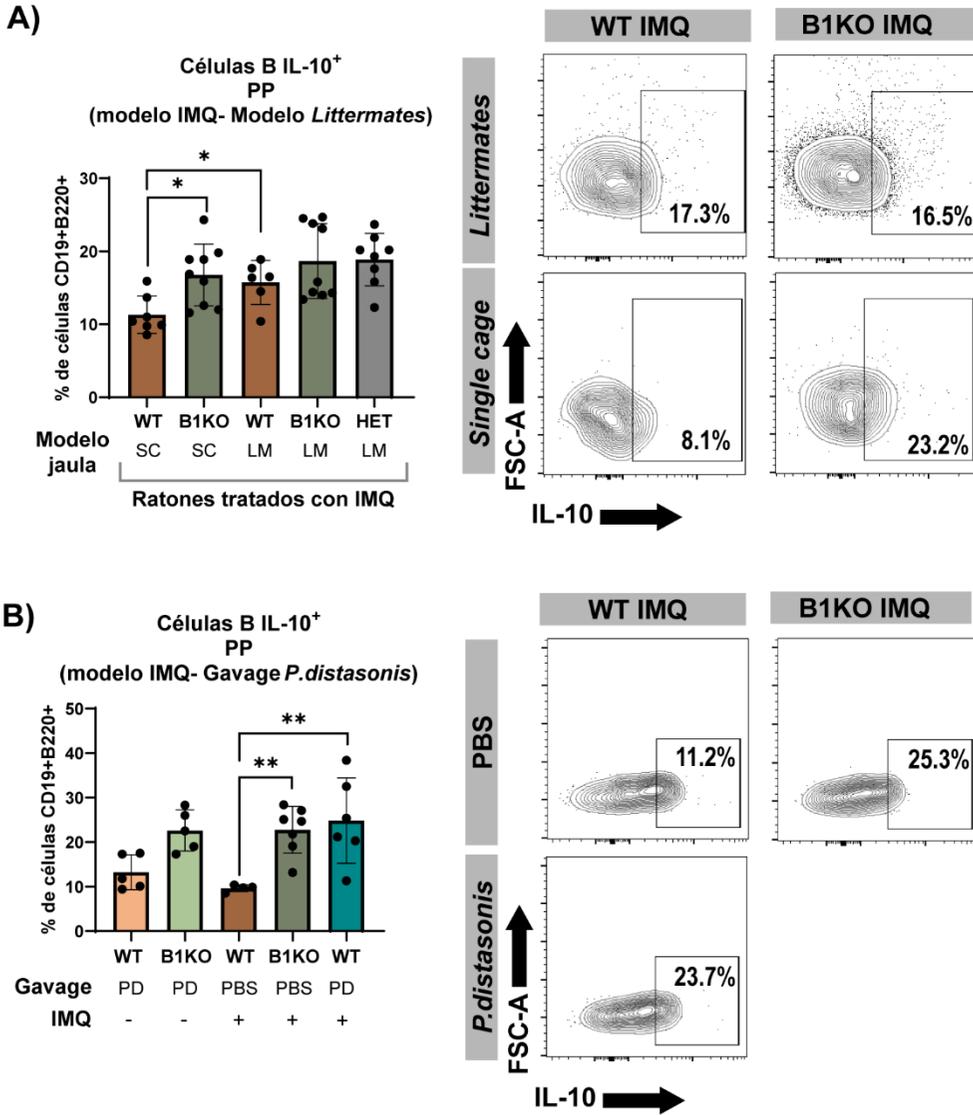
Figura 53. La presencia de *P. distasonis* en la microbiota intestinal se asocia con un incremento de la respuesta B IL-10⁺. A-B) Frecuencia de las células B IL-10⁺ caracterizada por citometría de flujo en las PP (A), mLN (A), SILP (B) y bazo (B) de ratones WT (n=5) y B1KO (n=5) tratados con IMQ o ratones del modelo TLR7Tg (WT n=7; TLR7Tg n=8; TLR7Tg/B1KO n=9). C) Frecuencia de células T IL-10 en PP del modelo de IMQ y modelo espontáneo medidas por citometría de flujo. D) Frecuencia de células B IL-10⁺ caracterizada por citometría de flujo tras la estimulación de células B *naïve ex vivo* con *P. distasonis* o *B. acidifaciens*. Estas células se purificaron de las PP, mLN Y bazo de ratones WT (n=11) y B1KO (n=10) de 20 semanas de edad. A-D: Las gráficas representan el valor medio con SD de experimentos llevados a cabo con ratones de 20 (modelo IMQ) o 32 (modelo TLR7Tg) semanas de edad. PP: placas de Peyer; SILP: Lámina propia del intestino delgado; mLN: ganglios linfáticos mesentéricos. Test estadístico de Mann-Whitney no pareado. *p≤0.05; **p≤0.01; la ausencia de asterisco se interpreta como ausencia de significación estadística.

En paralelo, la administración de *P. distasonis* a ratones WT tratados con IMQ indujo un incremento significativo de los niveles de células B IL-10⁺ respecto de los ratones WT que recibieron PBS de forma previa y concomitante a la inducción de lupus (Fig. 54B). Curiosamente, el incremento inducido en los ratones WT por la suplementación con *P. distasonis* alcanzó niveles comparables a los observados en ratones B1KO de forma natural tras la aplicación de IMQ (Fig. 54B).

6. Análisis global de la respuesta IgA, la composición de la microbiota y los signos de lupus.

El elevado volumen de datos producido durante el desarrollo de esta tesis doctoral se correlacionó para cada modelo con el objetivo de analizar de forma global los resultados. Para ello, se correlacionaron los cambios taxonómicos de la microbiota, las manifestaciones de la enfermedad y la respuesta IgA generada como vía de contacto de la respuesta inmunitaria y las bacterias intestinales.

En el modelo de análisis del efecto de normalización de la microbiota (comparativa de los ratones WT y B1KO en condiciones *single cage* y *littermates*) se encontró una fuerte asociación negativa entre *P. distasonis* y los niveles de la esplenomegalia y de autoanticuerpos anti-ADNdc (Fig. 55).



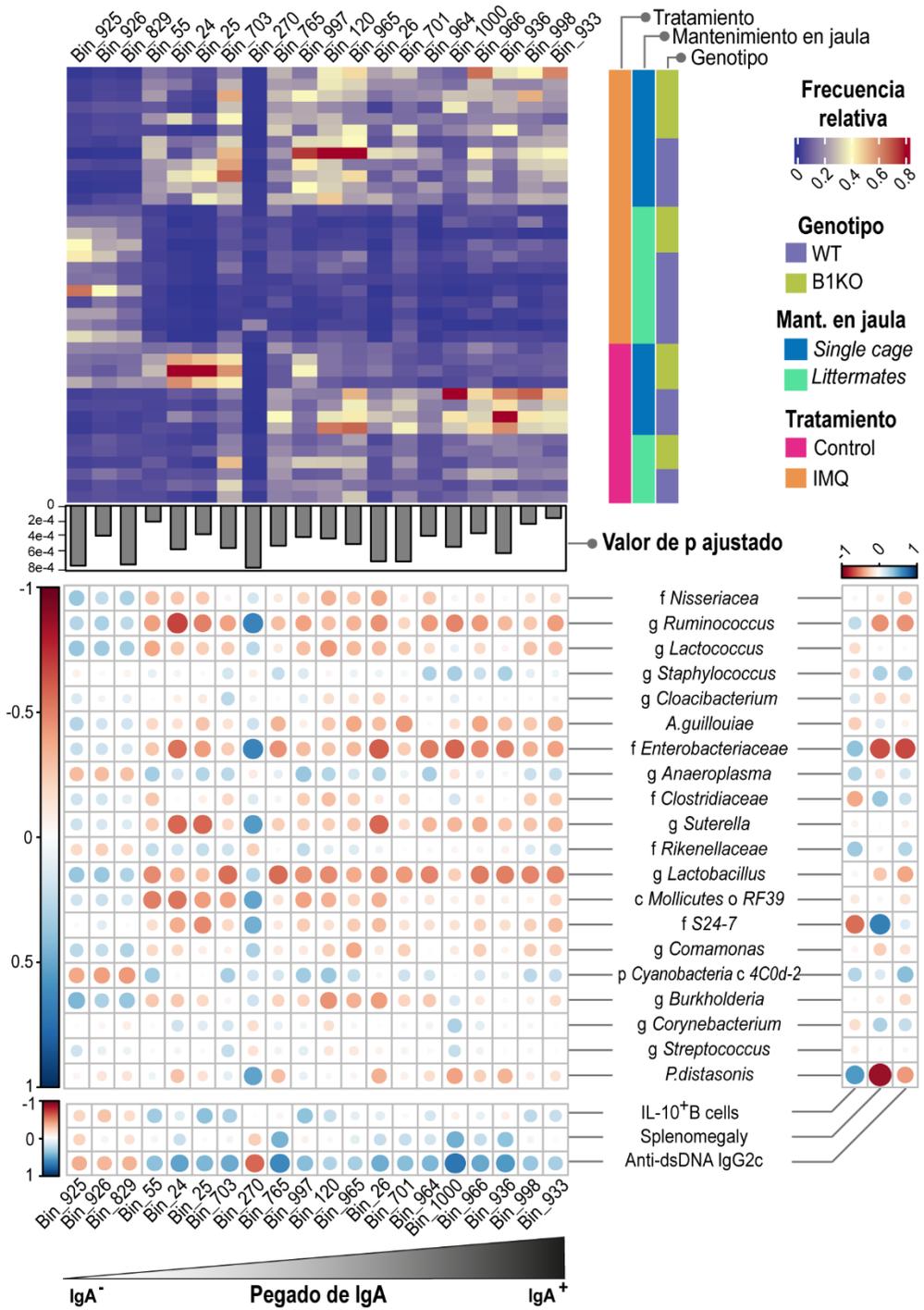


Figura 55. La presencia de una microbiota asociada al genotipo B1KO correlaciona positivamente con los niveles de células B productoras de IL-10 y negativamente con la sintomatología de la enfermedad. Parte superior: mapa de calor que representa las frecuencias relativas (gradiente azul-amarillo-rojo) de las poblaciones bacterianas (columnas) generadas en función de su cobertura de inmunoglobulina y seleccionadas por presentar las variaciones más marcadas entre los diferentes grupos de ratones analizados (filas). Las poblaciones se representan ordenadas en base al pegado de IgA que presentan (gradiente blanco-negro). Los valores de p ajustados mediante el método de Bonferroni-Hochberg tras realizar un análisis de Kruskal-Wallis entre los grupos se representan en el gráfico de barras inmediatamente debajo del mapa de calor. Parte central-inferior: matrices de correlación de las frecuencias de las *bins* bacterianas y la frecuencia relativa en heces de las especies más diferencialmente abundantes (matriz central, izquierda); correlación de la frecuencia de las *bins* bacterianas y los parámetros inmunológicos (esplenomegalia, niveles de autoanticuerpos IgG2c anti-ADNdc y frecuencia de células B IL-10+) (matriz inferior); correlación de los parámetros inmunológicos y la frecuencia relativa en heces de las especies más diferencialmente abundantes (matriz central, derecha). El color de los círculos de las matrices de correlación representa el parámetro r de Spearman (-1, rojo, correlación negativa fuerte; 0, blanco, ausencia de asociación; +1, azul, correlación positiva fuerte) y el diámetro es proporcional al valor absoluto de este parámetro.

En paralelo, los niveles de células B productoras de IL-10 en las PP mostraron una marcada asociación positiva con la concentración de *P. distasonis*. La integración del análisis multiparamétrico a nivel de célula única y su análisis en mapa de calor muestra de forma clara que los compartimentos con las mayores variaciones en su abundancia evolucionan de forma conjunta y similar ante los cambios de microbiota (Fig. 55, mapa de calor superior). Curiosamente, se encontró además una correlación que, aunque débil, era negativa entre la frecuencia de *P. distasonis* en heces y la abundancia de las poblaciones IgA⁺. De manera similar, el enriquecimiento de compartimentos IgA⁺ se correlacionó positivamente con los anticuerpos IgG2c anti-ADNdc, la esplenomegalia y, en menor medida, con las células B productoras de IL-10 derivadas de las placas de Peyer (Fig. 55). Algunas especies que presentaron las asociaciones más positivas con los niveles de células B IL-10⁺ e inversas con las manifestaciones de autoinmunidad fueron aquellas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Ruminococcus*. La familia S24-7, sin embargo, presentó una correlación positiva con la esplenomegalia y negativa con las células B productoras de IL-10 (Fig. 55). Por otra

parte, resultó llamativo que las poblaciones con una mayor cobertura de IgA presentaron una fuerte asociación positiva entre sí, y negativa con aquellas localizadas en la fracción IgA⁻ (Fig. 56).

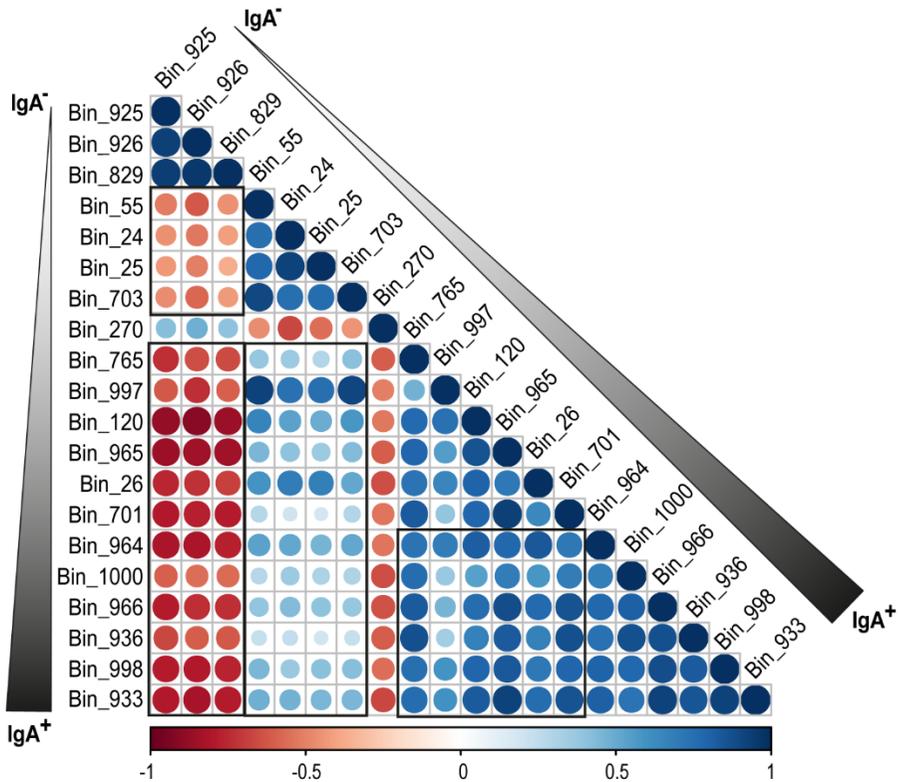


Figura 56. Las poblaciones con mayor pegado de IgA correlacionan positivamente entre sí y negativamente con aquellas IgA⁻. Análisis de correlación de la frecuencia relativa de las *bins* bacterianas representadas según su cobertura de IgA. Test de Spearman. El color de los círculos de las matrices de correlación representa el parámetro r de Spearman (-1, rojo, correlación negativa fuerte; 0, blanco, ausencia de asociación; +1, azul, correlación positiva fuerte) y el diámetro es proporcional al valor absoluto de este parámetro.

La aplicación de este análisis a los datos generados en el modelo de la suplementación oral con *P. distasonis* generó, de forma general, correlaciones más marcadas (valor absoluto más cercano a 1). En esta variación se encontró una correlación positiva entre los niveles de *P. distasonis* en heces y las células B productoras de IL-10 con la abundancia de las poblaciones bacterianas IgA⁺ (Fig. 57).

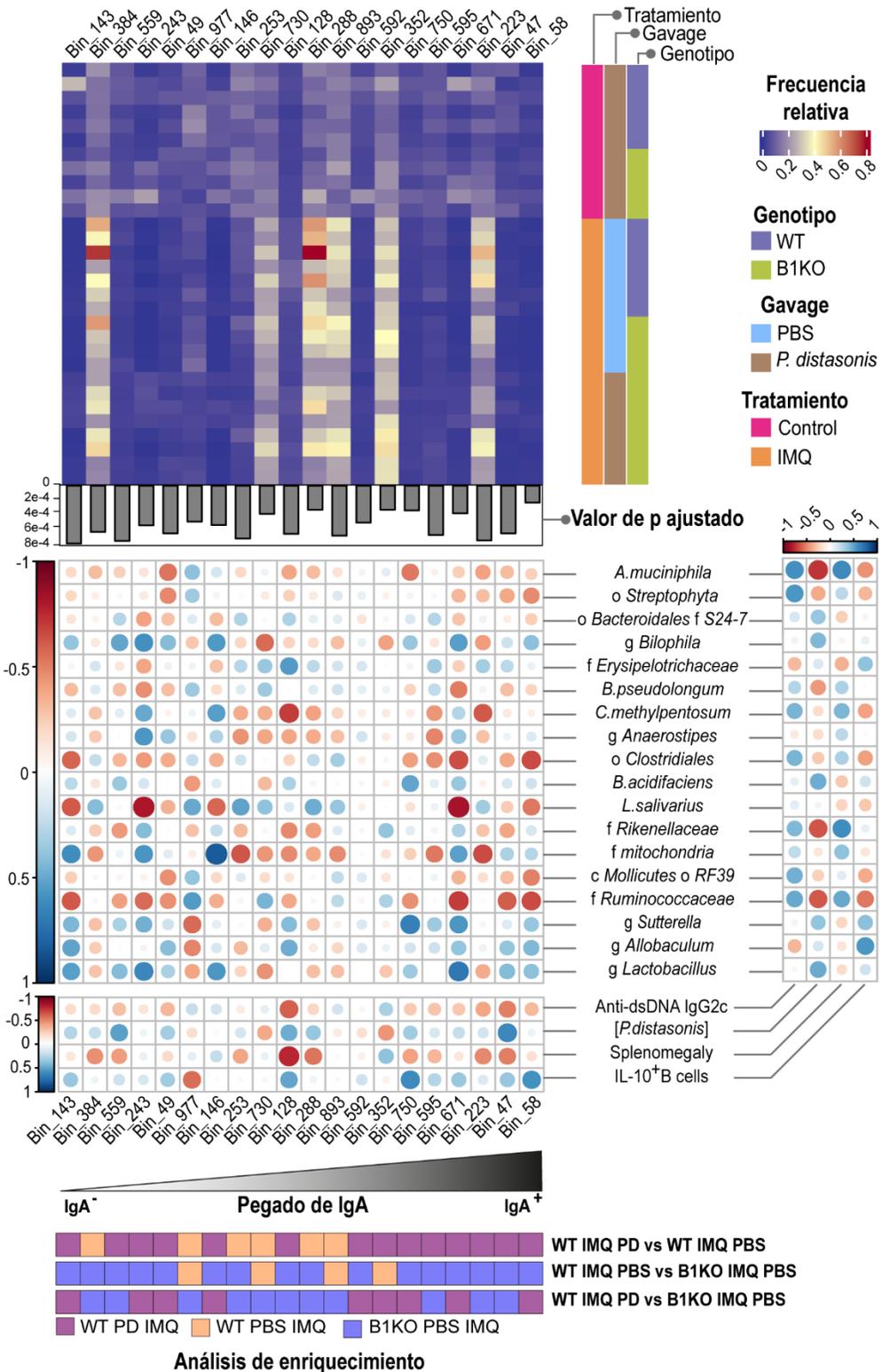


Figura 57. La suplementación con *P.distasonis* correlaciona positiva y fuertemente con los niveles de células B productoras de IL-10 y negativamente con la sintomatología de la enfermedad. Parte superior: mapa de calor que representa las frecuencias relativas (gradiente azul-amarillo-rojo) de las poblaciones bacterianas (columnas) generadas en función de su cobertura de inmunoglobulina y seleccionadas por presentar las variaciones más marcadas entre los diferentes grupos de ratones analizados (filas). Las poblaciones se representan ordenadas en base al pegado de IgA que presentan (gradiente blanco-negro). Los valores de p ajustados mediante el método de Bonferroni-Hochberg tras realizar un análisis de Kruskal-Wallis entre los grupos se representan en el gráfico de barras inmediatamente debajo del mapa de calor. Parte central-inferior: matrices de correlación de las frecuencias de las *bins* bacterianas y la frecuencia relativa en heces de las especies más diferencialmente abundantes (matriz central, izquierda); correlación de la frecuencia de las *bins* bacterianas y los parámetros inmunológicos (esplenomegalia, niveles de autoanticuerpos IgG2c anti-ADNdc y frecuencia de células B IL-10+) (matriz inferior); correlación de los parámetros inmunológicos y la frecuencia relativa en heces de las especies más diferencialmente abundantes (matriz central, derecha). El color de los círculos de las matrices de correlación representa el parámetro r de Spearman (-1, rojo, correlación negativa fuerte; 0, blanco, ausencia de asociación; +1, azul, correlación positiva fuerte) y el diámetro es proporcional al valor absoluto de este parámetro. En la parte inferior del gráfico se muestran los resultados simplificados del análisis de enriquecimiento por parejas (ratones WT suplementados con PBS vs B1KO suplementados con PBS, WT suplementados con *P.distasonis* vs WT suplementados con PBS y B1KO suplementados con PBS vs WT suplementados con *P.distasonis*). Para cada comparativa se ha generado un color indicando en qué grupo es mayor la frecuencia de la *bin* en concreto (rosa: enriquecimiento en ratones WT tratados con IMQ y suplementados con *P.distasonis*; naranja: enriquecimiento en ratones WT tratados con IMQ y suplementados con PBS; morado: enriquecimiento en ratones B1KO tratados con IMQ suplementados con PBS).

Estas *bins*, a su vez, presentaron una asociación negativa con los niveles de esplenomegalia y de autoanticuerpos anti-ADNdc. Entre los taxones más fuertemente asociados con la inducción de una respuesta B IL-10⁺ se encuentran los géneros *Allobaculum* y *Suterella* y la familia *Erysipelotrichaceae* (Fig. 57).

Los resultados detallados en los apartados anteriores y correlacionados en este último ilustran la relación entre la genética y la mediación de la respuesta inmunitaria a través de la microbiota.

DISCUSIÓN

Los procesos de autoinmunidad afectan en la actualidad a un porcentaje comprendido entre el 5 y el 10% de la población mundial³³³. Como consecuencia, en las últimas décadas se han realizado numerosos avances en la investigación de las disregulaciones inmunitarias que ocurren en estos pacientes, generándose nuevas terapias y criterios de diagnóstico. Sin embargo, dentro de esta línea, el LES constituye actualmente uno de los mayores retos por la falta de un diagnóstico preciso y la amplia variedad de manifestaciones encontrada en los pacientes².

Los avances en la investigación de la fisiopatología del LES han permitido identificar alelos de susceptibilidad y factores ambientales relacionados con el desarrollo y la prognosis de la sintomatología. Aunque gracias a estos trabajos se han podido estudiar con más detalle las alteraciones inmunitarias que median el LES, los mecanismos que median las manifestaciones de la enfermedad continúan siendo una pregunta sin respuesta. En la actualidad, el manejo farmacológico de los pacientes de LES está dirigido a tratar las lesiones en los órganos más afectados, siendo estos el riñón, la piel, las articulaciones, el sistema nervioso central, y los pulmones⁶⁹.

En paralelo, la microbiota se establece como un factor de importancia creciente en las investigaciones del LES, al haberse probado en muchos trabajos la influencia directa de la composición bacteriana intestinal en el desarrollo de esta y otras enfermedades autoinmunes. A pesar de esto, las manifestaciones del LES en el intestino y la respuesta inmunitaria local no ha sido, hasta muy recientemente, objeto de estudio de las afecciones causadas por el desarrollo del LES³³⁴.

Ante esta situación, la tesis presentada surge con el objetivo principal de entender mejor la interacción entre la predisposición genética y los desencadenantes ambientales, en un intento de obtener una visión integral y completa de los mecanismos que subyacen la fisiopatología del LES. Para abordar esta cuestión, se ha llevado a cabo una extensa caracterización de la respuesta inmunitaria intestinal, así como de la susceptibilidad a ser modulada mediante la composición de la microbiota intestinal.

Para llevar a cabo dicha investigación, se usaron dos modelos murinos de lupus mediados por la señalización de TLR7, por lo que inicialmente se evaluaron las manifestaciones fenotípicas de esta ruta de activación en ratones modificados genéticamente para sobreexpresar el gen *Tlr7* en el cromosoma Y (TLR7Tg).

Los resultados obtenidos de la caracterización de este modelo probaron que los ratones TLR7Tg presentan, desde las 12 semanas de edad, manifestaciones de autoinmunidad como la esplenomegalia y la presencia de autoanticuerpos con reactividad al ADNdc de isotipo IgG2c e IgG total en niveles significativamente mayores que sus controles WT. La evaluación de estos parámetros probó la validez de este modelo para el estudio del LES en ratones de experimentación, confirmando así los resultados de otros grupos¹⁸.

A continuación, se analizó como esta inducción de autoinmunidad en los ratones TLR7Tg se manifestaba a nivel intestinal, abordando así una de las áreas menos exploradas en la investigación actual sobre el LES. El análisis del intestino se llevó a cabo desde el punto de vista estructural e inmunitario, y permitió concluir que la sobreexpresión de TLR7 inducía en los ratones un incremento en la permeabilidad intestinal con alteraciones en el patrón de expresión de las proteínas claudina-1 y ocludina en el epitelio del intestino delgado.

Tanto la claudina-1 como la ocludina están implicadas en el correcto establecimiento de las uniones estrechas intercelulares de tipo TJ, las cuales a su vez se localizan en la membrana basolateral de los enterocitos intestinales y regulan el paso paracelular de bacterias y antígenos alimenticios³³⁵. Los cambios en el patrón de localización de ambas proteínas encontrados en los ratones TLR7Tg indicaron un acoplamiento incompleto de las TJ en los enterocitos. La información disponible en la bibliografía muestra que los ratones deficientes en *Cldn2* presentan una pérdida notable de la permeabilidad catiónica en el intestino delgado, lo que indica que la ausencia de las proteínas de las TJ es suficiente para alterar el correcto funcionamiento de las uniones estrechas en el mantenimiento de la barrera^{336,337}. Esta observación explicaría el incremento en el paso de dextrano a sangre periférica encontrada en nuestro modelo. Adicionalmente, los resultados encontrados en nuestro trabajo coinciden con lo descrito en la literatura en modelos de artritis³³⁸, donde el desarrollo de la enfermedad en localizaciones extraintestinales implica un incremento en la permeabilidad intestinal.

En otros trabajos se ha asociado la acumulación de claudina-1 y ocludina en el citoplasma de enterocitos del intestino delgado con un incremento en la concentración de citoquinas proinflamatorias en el GALT³³⁸, sugiriendo que las alteraciones intestinales podrían estar ocurriendo en paralelo a una respuesta inflamatoria local o sistémica. Siguiendo esta premisa, se procedió a la evaluación de la activación inmunitaria mediante la caracterización de los centros germinales. En contextos de autoinmunidad, estas estructuras se han asociado con un incremento en la respuesta autorreactiva al favorecer la activación y expansión de clones de células B productoras de autoanticuerpos³³⁹. Los ratones TLR7Tg presentaron frecuencias de células B de centro germinal significativamente mayores que las encontradas en los ratones WT en placas de Peyer y bazo, indicando una coordinación entre la respuesta de CG intestinal y periférica. A pesar de que la respuesta inmunitaria de ambas localizaciones está

sujeta a mecanismos independientes de regulación³⁴⁰, se ha visto que en pacientes de autoinmunidad hay un eje de células B IgM⁺ que migran entre el intestino y el bazo³⁴¹, lo cual podría parcialmente explicar la similitud encontrada entre los dos compartimentos en nuestro modelo.

La respuesta inmunitaria intestinal en los ratones TLR7Tg se vio afectada también a nivel de células B productoras de IgA. Tanto en las placas de Peyer como en la lámina propia de ratones TLR7Tg se dio una expansión de células plasmáticas de vida corta productoras de IgA (B220⁺), mientras que no se observaron diferencias en las células plasmáticas productoras de IgA de vida larga (B220). Dichos cambios celulares se tradujeron en un incremento en la secreción de IgA hacia el lumen en ratones TLR7Tg, pero esta inmunoglobulina, cuya función principal es la interacción con la microbiota, no mostró frecuencias de unión diferenciales a las bacterias entre ambos genotipos. Este hecho, llamativo al inicio, es común con otros modelos de autoinmunidad, como los ratones K/BxN con susceptibilidad al desarrollo de artritis. En ellos, las alteraciones en la secreción de IgA al lumen gastrointestinal no se tradujeron en cambios en la frecuencia de bacterias IgA⁺³⁴².

Las dinámicas del pegado de IgA hacia las bacterias intestinales son complejas y bidireccionales, donde la composición de las bacterias determina la respuesta inmunitaria intestinal IgA y, a su vez, la especificidad y el nivel de cobertura de estas inmunoglobulinas en las superficie de las bacterias determina su capacidad de colonización³²⁷. Partiendo de esta premisa, se evaluó si los cambios en los niveles de IgA observados en ratones TLR7Tg podrían estar regulando la composición de la microbiota, para lo cual se secuenció el gen ARNr 16S. Estos resultados mostraron microbiomas colonizados por especies significativamente diferentes entre ambos genotipos, con la especie *Bacteroides acidifaciens* presentando los cambios más notables. Esta bacteria se encontró exclusivamente en el ecosistema intestinal de

ratones TLR7Tg, mientras que apareció ausente en la microbiota de ratones WT. Esta bacteria se ha reportado también como especie sobrecolonizadora del intestino de ratones hembra del modelo murino de lupus TLR7.Tg.1, indicando que *B. acidifaciens* presenta una asociación con el fenotipo de lupus mediado por TLR7 con independencia del sexo y la edad de los ratones¹⁷⁸.

Además de los modelos de lupus, *B. acidifaciens* se ha asociado también con otras patologías, pero su naturaleza protectora o patogénica depende de los mecanismos subyacentes a la enfermedad estudiada. Por ejemplo, en modelos de lesión patológica hepática mediada por CD95, la presencia de *B. acidifaciens* confiere un estado protector al inhibir la apoptosis de los hepatocitos³⁴³, y en modelos de infección, protege frente a la infección por *Salmonella typhimurium* mediante la secreción de propionato³⁴⁴. Por el contrario, la colonización de *B. acidifaciens* tras la administración de antibióticos acarrea una peor prognosis en la quimioterapia con platino³⁴⁵. Además, se ha visto en un modelo de destete temprano en cabras, que la presencia de esta bacteria en la microbiota intestinal incrementa la muerte de células B por apoptosis y disminuye la expresión y ensamblaje de claudina-1³⁴⁶. Finalmente, se ha probado en otros trabajos que la monocolonización en ratones GF con *B. acidifaciens* induce una potente y significativa respuesta de células IgA⁺ en las placas de Peyer³⁴⁷. De forma conjunta, estos trabajos sugieren un posible mecanismo que explicaría el incremento de células B de vida corta productoras de IgA⁺ en los ratones TLR7Tg, y no en los WT, asociado a la presencia de *B. acidifaciens* en la microbiota intestinal.

Las alteraciones descritas en la función barrera de los ratones TLR7Tg en nuestro modelo es conocida comúnmente como el estado de “intestino permeable”, y se ha asociado en otros trabajos como una primera causa de translocación bacteriana no regulada³³¹. En base a estos resultados, se hipotetizó que en los ratones TLR7Tg se podría estar dando el paso de bacterias desde la luz del intestino delgado hacia la

circulación sistémica, donde modificaría la respuesta periférica. Esta teoría se comprobó mediante la evaluación de la respuesta de las inmunoglobulinas circulantes en ratones WT y TLR7Tg frente a bacterias comensales autólogas y heterólogas por ELISA y por citometría de flujo, donde se encontró una disminución notable de la respuesta IgM en ratones TLR7Tg hacia bacterias fecales. Esta observación es similar a lo encontrado en pacientes de LES, donde los niveles séricos de IgM con reactividad hacia polisacáridos bacterianos³⁴⁸ o hacia endotoxinas de bacterias³⁴⁹ están significativamente disminuidos y correlacionan de forma inversa con la severidad de la enfermedad. En este trabajo no se determinó la especificidad antigénica de las IgM circulantes, pero sí se evaluó la respuesta sistémica específica frente a *B. acidifaciens*, por ser la bacteria más diferencialmente abundante entre los intestinos de ambos genotipos.

En estos experimentos, los ratones TLR7Tg presentaron niveles significativamente mayores de IgA, IgG2c e IgM en suero con reactividad hacia *B. acidifaciens*. Además, se encontró en estos ratones un incremento significativo de los niveles totales de IgA, IgG2c e IgM, indicando una mayor actividad inmunitaria en la periferia. Esto se vería apoyado por un estudio realizado en pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal donde se probó que, en situaciones de elevada permeabilidad intestinal, los fenómenos de translocación bacteriana inducen una notable respuesta de IgG presente en el suero³²⁹. La activación de células inmunitarias por bacterias no induce exclusivamente una respuesta de tipo IgG, sino que se ha visto también que se puede dar una respuesta de tipo IgA e IgM (10.3390/antib12010004). Ambas observaciones, de forma conjunta, llevaron a concluir que los resultados encontrados en ratones TLR7Tg sugieren una alta tasa de translocación de *B. acidifaciens* hacia la periferia.

De forma llamativa, aunque la respuesta sérica hacia *B. acidifaciens* fue mayor en los ratones TLR7Tg para los tres isotipos analizados, la respuesta de IgM presentó una

magnitud inesperadamente alta. La evaluación de estos anticuerpos demostró un elevado nivel de especificidad por *B. acidifaciens* y no por *P. distasonis*, una bacteria que se usó como control no relacionado, descartando así la posibilidad de que la elevada respuesta se debiera a una respuesta policlonal primaria frente a señales de PAMPs^{350,351}. El análisis de la respuesta IgM contra *B. acidifaciens* individual de cada ratón con la concentración de IgM específicos del ADNdc demostró una fuerte y significativa correlación solo en ratones TLR7Tg, y la incubación de esta bacteria con sueros de TLR7Tg fue capaz de inhibir el pegado de los anticuerpos circulantes IgM al ADNdc. Ambos experimentos, interpretados en conjunto, sugieren una posible reactividad cruzada entre los anticuerpos generados frente a *B. acidifaciens* y estructuras autoantigénicas nucleares en los ratones TLR7Tg.

Esta teoría sugeriría un modelo de acción al propuesto para la diabetes de tipo 1 asociada al alelo de riesgo HLA A*24:02, para el cual se ha elucidado un mecanismo de destrucción de las células β -pancreáticas mediada por un clon de células T cuyo TCR presenta reactividad cruzada por una molécula antigénica del género *Klebsiella*. Según esta hipótesis, el contacto de las células T autorreactivas con bacterias de este taxón, en el intestino o en localizaciones sistémicas, induciría una expansión del clon autorreactivo, retroalimentando y empeorando el fenotipo de autoinmunidad³⁵². En el presente trabajo, los resultados obtenidos en ratones TLR7Tg permiten hipotetizar un modelo similar de activación de células B secretoras de autoanticuerpos. Además, en el contexto del LES, múltiples trabajos han sugerido un posible fenómeno de reactividad cruzada entre proteínas de superficie del virus Epstein-Barr y los autoantígenos Smith y Ro^{353,354}. Para confirmar esta hipótesis en nuestro modelo, el estudio se podría beneficiar de la secuenciación del BCR de las células intestinales de las placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos, así como de experimentos de producción de anticuerpos monoclonales frente a *B. acidifaciens* y el estudio de su especificidad y avidéz.

Analizadas las manifestaciones sistémicas e intestinales del modelo murino de lupus mediado por la sobreexpresión de TLR7, se procedió a evaluar la influencia del fondo genético en nuestro modelo. Los trabajos dirigidos a la identificación de alelos de riesgo en el LES han identificado numerosos polimorfismos del gen *Bank1* con el desarrollo del LES y otras enfermedades autoinmunes. Para investigar el papel de este gen, se usaron ratones genéticamente modificados donde *Bank1* se eliminó de la línea germinal y se evaluó el efecto de esta modificación mediante dos modelos de lupus: uno mediado por la sobreexpresión de TLR7 y otro en el que se aplicó tópicamente el agonista de TLR7 IMQ a ratones entre las 12 y las 20 semanas de edad.

La depleción de *Bank1* del fondo genético indujo en ratones en estado basal, sin inflamación, una disminución significativa del reclutamiento de células B con perfil no diferenciado (IgM⁺ IgD⁺) hacia la lámina propia intestinal. Sin embargo, estas células presentaban niveles similares a los ratones WT de la integrina $\alpha_4\beta_7$, altamente implicada en la migración y recirculación de células B hacia el intestino³⁵⁵. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que en este trabajo no se evaluaron otros factores que podrían influir en la migración de las células B, como es el estado de activación de dicha integrina^{355,356}, los niveles de expresión de su receptor MAdCAM-1 en las células endoteliales intestinales³⁵⁵ ni la presencia de otras integrinas que, aunque en menor grado, también se asocian con la recirculación de células B al intestino, como la α_E ³⁵⁷. Por otro lado, y a pesar de esta reducción de células B *naïve* en ratones B1KO, la ausencia de *Bank1* indujo una acumulación de células B productoras de IgA de vida corta (B220⁺) y de vida larga (B220⁻) en las placas de Peyer, pero una disminución de las mismas en la lámina propia.

Esta reducción podría deberse, por un lado, a la menor disponibilidad de células B totales en las placas de Peyer, lo cual limitaría el número de células plasmáticas

productoras de IgA que se pueden generar en los centros germinales y migrar hacia la lámina propia³⁵⁸. Por otro, se sabe que las células plasmáticas diferenciadas en las placas de Peyer constituyen una fuente de células productoras de IgA para otros órganos linfoides³⁵⁹, por lo que la acumulación de células productoras de IgA en las placas de Peyer podría ser la causa de una migración defectiva hacia otras localizaciones.

Tras la inducción de lupus mediante la aplicación de IMQ, los niveles de células B totales, así como de células B productoras de IgA en placas de Peyer y lámina propia se igualaron en ratones WT y B1KO. La igualación de estas respuestas podría explicarse mediante la alta expresión de CCR6 y CCR9 por parte de las células B en condiciones inflamatorias, lo cual incrementa la migración hacia las placas de Peyer mediante la interacción con CCL20 y CCL25, respectivamente³⁵⁸. Estas observaciones podrían explicar conjuntamente lo observado en ratones WT y B1KO tratados con IMQ, pero se hace necesario el análisis de la expresión de integrinas y sus receptores implicados en la migración de células B y células plasmáticas IgA⁺ para poder sacar alguna conclusión.

El ligando de TLR7 usado en el modelo agudo, IMQ, se ha usado también en modelos de psoriasis³⁶⁰. Un estudio realizado en 2016 reportó por primera vez que la inhibición del acceso de los ratones a la crema por vía oral mediante un collarín limita la sintomatología sistémica a un cuadro de psoriasis³⁶¹⁻³⁶³. Sin embargo, la aplicación de IMQ en la oreja de los ratones según lo descrito en la metodología de este trabajo permie que esta sustancia alcance el intestino y estimule la respuesta TLR7 de forma local, dando lugar a un modelo murino de lupus. Esta observación respalda la implicación de la respuesta inmunitaria intestinal en la fisiopatología del lupus y acentúa la importancia de este trabajo.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el modelo espontáneo y el agudo mostraron que hubo una mejora en la severidad de las manifestaciones fenotípicas de esplenomegalia y presencia de autoanticuerpos anti ADNdc en ratones *Bank1*^{-/-} en ambos modelos (ratones B1KO tratados con IMQ y ratones TLR7Tg.B1KO) en comparación con sus controles *Bank1*^{+/+} (ratones WT tratados con IMQ y ratones TLR7Tg). Adicionalmente, en este trabajo se aumentó la caracterización de las afecciones derivadas del desarrollo de lupus mediante el estudio de la permeabilidad intestinal y el daño renal. En ambos modelos, los ratones B1KO con lupus presentaron una menor permeabilidad intestinal acompañada de una distribución membranal de la claudina-1, así como niveles significativamente menores de puntuación de daño glomerular en comparación con los ratones *Bank1*^{+/+}. Mediante estos resultados, se reforzó el conocimiento previo sobre la ausencia de *Bank1* y su influencia en la respuesta autoinmune sistémica mediada por la sobreactivación de TLR7¹⁴⁹, pero se mostró además por primera vez cómo afecta a respuesta local intestinal.

Si bien es cierto que la genética forma la base de las enfermedades crónicas mediadas por el sistema inmunológico, a menudo se requieren desencadenantes ambientales y disbiosis microbiana para que el fenotipo de la enfermedad se manifieste¹⁷¹. La eliminación de *Bank1* en ambos modelos reflejó el papel del fondo genético en la determinación de la composición de la microbiota intestinal³⁶⁴. Así, los ratones *Bank1*^{-/-} con lupus presentaron cambios en la composición de las bacterias intestinales respecto a sus homólogos *Bank1*^{+/+}, observados exclusivamente en los indicadores de la beta diversidad. La alfa diversidad proporciona información sobre el número de especies encontrado, la representación de cada una de ellas y las relaciones filogenéticas encontradas³²⁸. La beta diversidad, por su parte, evalúa la identidad de las especies que forman cada uno de los ecosistemas, valorando cuán diferentes son los taxones entre ambos grupos. Los resultados encontrados en ratones *Bank1*^{-/-} y *Bank1*^{+/+}

indican que el número total de especies observado y su distribución no se ve afectada por la eliminación del gen, pero sí los OTUs encontrados. De forma similar a nuestros resultados, se ha reportado en otros modelos de lupus que, tanto los ratones del modelo triple congénito B6.*Sle1.Sle2.Sle3*, como los del modelo B6.TLR7.Tg.1 presentaron niveles similares a sus controles en alfa diversidad, siendo la beta diversidad la que permite identificar los cambios entre las comunidades tras el desarrollo de lupus^{178,179}. Los cambios en la microbiota encontrados en nuestro trabajo presentaron dinámicas diferentes entre el modelo agudo y el espontáneo, lo cual apoya otros estudios que han sugerido una diferente adaptación de la composición de la microbiota intestinal a las situaciones de inflamación en situaciones crónicas y agudas^{179,183}.

La ausencia de *Bank1* indujo en ambos modelos una expansión en la frecuencia de *P. distasonis* en comparación con los ratones WT tratados con IMQ en el modelo agudo y los ratones TLR7Tg en el espontáneo. Estos resultados llevaron a hipotetizar que la proliferación diferencial de este y otros taxones de forma exclusiva en los ratones B1KO con lupus podría ser un elemento mediador de la mejora en la gravedad de las manifestaciones fenotípicas observadas en dichos ratones. Dicha teoría fue comprobada mediante la incorporación de esta bacteria como parte de la microbiota intestinal de ratones con lupus *Bank1*^{+/+} mediante el uso de un modelo de *littermates* o mediante la suplementación oral directa de *P. distasonis*. Los ratones WT con *P. distasonis* como parte de su microbiota comensal presentaron niveles de esplenomegalia, autoanticuerpos anti ADNdc, permeabilidad intestinal y daño renal comparables a los encontrados en ratones B1KO, siendo una fenocopia de los mismos. Estos hallazgos coinciden con lo encontrado en modelos murinos de esclerosis múltiple³⁶⁵, artritis inflamatoria y colitis³⁶⁶, en los cuales *P. distasonis* exhibió propiedades antiinflamatorias.

La modificación de la microbiota intestinal se ha convertido en una herramienta recurrente en la investigación con animales de experimentación en los últimos años. Su uso ha permitido la identificación de determinadas especies con efecto protector o de susceptibilidad en el desarrollo del LES, artritis o cáncer. Así, se ha reportado que el *cohousing* de ratones WT con ratones TLR7.Tg.1, es suficiente para inducir en los ratones sanos manifestaciones de lupus, con incremento en la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana, esplenomegalia y lesiones en riñón e hígado¹⁷⁸. Adicionalmente, la monocolonización de ratones por *E.gallinarum*¹⁷⁷, la transferencia de bacterias del género SFB³⁶⁷ y la colonización por los géneros *Desulfovibrio* y *Lactobacillus*¹⁷⁸ son fenómenos capaces de inducir el desarrollo de manifestaciones de LES. Sin embargo, el papel de la microbiota según la literatura disponible resulta controvertido. En el modelo murino de lupus BXD2 se ha visto que ratones GF y SPF desarrollan manifestaciones comparables a nivel de daño renal y articular, resaltando así la importancia del fondo genético sobre la composición de la microbiota³⁶⁸. A pesar de esta observación, en este estudio se vio también que los ratones GF presentaron un desarrollo más lento de la enfermedad, sugiriendo un papel de la microbiota que, aunque pasivo, sigue siendo importante.

Nuestros resultados obtenidos del modelo espontáneo indicaron que la presencia de *P. distasonis* en la microbiota de ratones TLR7Tg.B1KO se asoció con un menor incremento de la permeabilidad intestinal ante el desarrollo de la enfermedad, en comparación con los ratones TLR7Tg. Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía con el modelo murino espontáneo de lupus MRL/lpr. En dicho trabajo, la administración oral de *Lactobacillus spp* no fue suficiente para inhibir el desarrollo de lupus, pero sí para revertir el estado de permeabilidad intestinal³⁶⁹. Muy relacionado con este hecho, se ha demostrado también que la relación causal entre la composición de la microbiota y el desarrollo de la autoinmunidad parece presentar un efecto dependiente del tiempo. El trasplante fecal de ratones con susceptibilidad a

lupus B6.*Sle1.Sle2.Sle3* a ratones GF solo logró inducir lupus en los ratones receptores cuando los ratones donantes presentaban manifestaciones de autoinmunidad en curso¹⁷⁹. Esta hipótesis está respaldada por observaciones sobre el tratamiento antibiótico para la eliminación de las bacterias intestinales en ratones MRL/lpr, el cual ejerce un papel protector solo cuando se realiza en la etapa pre-sintomática, pero no muestra mejoras una vez que la enfermedad ha comenzado a manifestarse¹⁸².

La dinámica de suplementación con *P. distasonis* diseñada en este trabajo demuestra, por un lado, la capacidad de *P. distasonis* para colonizar el intestino de ratones WT y, por otro, la capacidad inmunomoduladora de esta especie ante el desarrollo de lupus mediado por TLR7. De esta forma, nuestros resultados sugieren que la microbiota podría modular los efectos asociados al fondo genético, actuando como mediador de las respuestas inmunitarias. Esta teoría se ve apoyada por otros estudios disponibles en la bibliografía donde se ha probado que el *cohousing* de ratones BALB/c WT y ratones BALB/c sin eosinófilos es capaz de inducir una normalización de la respuesta IgA. Hasta el momento de la publicación de este estudio, se asumía que los eosinófilos eran un componente clave para el mantenimiento de la respuesta IgA, pero dicho paradigma se modificó al probar que los eosinófilos ejercen dicha acción a través de modificaciones en la microbiota. Así, la transferencia de la microbiota de los ratones WT es capaz de inducir en los ratones sin eosinófilos la misma respuesta IgA²³⁵.

Además de los cambios en la composición de la microbiota, la eliminación de *Bank1* en el modelo agudo y en el espontáneo reflejó la influencia del fondo genético en la identidad de las bacterias cubiertas por IgA. El pegado de IgA hacia las bacterias fecales durante el desarrollo de enfermedades autoinmunes ha sido sugerido como un potencial regulador de la secreción de citoquinas proinflamatorias, jugando un papel clave en la regulación de la respuesta inmunitaria.

A pesar de que la deficiencia de *Bank1* se tradujo en cambios en la cantidad de IgA libre secretada al lumen gastrointestinal en ratones con lupus y en homeostasis en los dos modelos, estas inmunoglobulinas presentaron la capacidad de unirse a las bacterias fecales en frecuencias similares a sus homólogos *Bank1*^{+/+}, aunque de forma diferencial. Un comportamiento similar se ha encontrado en ratones NOD en un modelo de diabetes tipo 1^{342,370}, y ratones deficientes para la tirosina-quinasa de Bruton donde los perfiles IgA⁺ cambiaban a pesar de encontrarse frecuencias similares de bacterias cubiertas de IgA con ratones WT. Para comprender en más detalle cómo se altera la respuesta IgA hacia las bacterias en ausencia de *Bank1*, se llevó a cabo un análisis multiparamétrico por citometría de flujo de las bacterias de la microbiota. Esta tecnología está a la vanguardia en el estudio de las bacterias intestinales, con una aplicación en el campo de la autoinmunidad limitada y solo utilizada anteriormente en un modelo de colitis³⁷¹.

Con la normalización de la microbiota en el modelo de *littermates*, todos los ratones presentaron, con independencia de su genotipo, un incremento en la frecuencia de las poblaciones cubiertas con IgA, similar a lo observado en ratones B1KO *single cage* tras el tratamiento con IMQ. Además, las bacterias con mayor pegado de IgA mostraron una fuerte correlación entre sus abundancias. Este cambio en el pegado de IgA podría ser el mecanismo por el cual el fondo genético *Bank1* regula la composición de la microbiota. Esta teoría se sustenta en la observación de que, en modelos murinos de colitis, las fracciones IgA⁺ e IgA⁻ permiten la identificación de bacterias colitogénicas y no colitogénicas, determinando la capacidad de colonización de unas y otras³⁷².

En paralelo, el estudio cinético del pegado de IgA en los diferentes estados de desarrollo de lupus en el modelo transgénico mostró que las poblaciones bacterianas que más variación exhiben en sus frecuencias varían en su patrón de pegado de IgA.

Este seguimiento temporal ilustró que la ausencia de *Bank1* en estos ratones no impide que la comunidad microbiana adquiera, en última instancia, el perfil de pegado de IgA asociado a los ratones TLR7Tg. En cambio, la eliminación del gen parece retrasar esta transición, observándose en los ratones TLR7Tg.B1KO a edades intermedias un perfil más similar al de los WT. Este análisis permite visualizar que las poblaciones bacterianas que presentan las mayores diferencias varían con la edad, siendo únicas para cada etapa y evidenciando que las poblaciones con frecuencias más dispares entre los tres grupos a edades tempranas tienden a igualarse en las etapas posteriores, mientras que las poblaciones más diferenciales en la vejez se encontraban a niveles similares en los tres genotipos en la juventud.

El estudio del pegado de IgA en los diferentes estadios del modelo espontáneo puede ser clave debido a que en torno a un 68% de los pacientes de LES presentan autoanticuerpos de isotipo IgA anti ADNdc^{373,374}. Debido a que la mayor producción de IgA ocurre en el GALT, se podría sugerir que hay una posible activación intestinal de estos clones de células B autorreactivas. Por ello, la dinámica de la respuesta de IgA en el tejido linfoide intestinal podría ser crucial en la patogénesis autoinmune sistémica inicial en individuos con alelos de susceptibilidad²⁵³.

En los estudios de comunidades microbianas no solo la identidad de las especies proporciona información, sino que resulta crucial entender como los taxones interactúan con el sistema inmunitario. Los azúcares presentes en las superficies bacterianas pueden actuar como potentes inductores de la respuesta inmunitaria innata, a través de la activación de TLRs³⁷⁵. Además, el análisis del ecosistema bacteriano puede aportar información sobre el perfil inflamatorio, la capacidad de adhesión y/o formación de biopelículas (comúnmente referidos como *biofilms*) y la interacción con los receptores inmunomoduladores tipo Siglec³⁷⁶.

Los resultados del análisis de patrones de glicosilación llevados a cabo en este trabajo han mostrado que la presencia de *P. distasonis* en el intestino modifica la composición microbiana hacia un ecosistema rico en oligómeros de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, definidos por un enriquecimiento en poblaciones que pegan STL. La presencia de estas estructuras en los perfiles bacterianos intestinales se ha asociado con una inhibición de la respuesta T efectora, mejorando así las manifestaciones de autoinmunidad en modelos de encefalomielitis autoinmune experimental³⁷⁷ y diabetes³⁷⁸.

Para la consecución de los últimos objetivos planteados en este trabajo se investigaron las poblaciones de células B con potencial capacidad reguladora. Las células Bregs incluyen un conjunto de células B con propiedades antiinflamatorias mediadas por la secreción de IL-35, IL-10 y/o granzima B³⁷⁹. En pacientes de LES, se ha visto que la síntesis de IL-10 y el número de células B que la producen están disminuidos, un hecho que se asocia con una peor prognosis de la enfermedad²⁷³. El análisis conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis sobre la diferenciación de células productoras de IL-10 indica que la presencia de *P. distasonis* en la microbiota de los ratones con lupus es un potente inductor de células B *naïve* hacia un fenotipo IL-10⁺ en las placas de Peyer. Así, los ratones tratados con IMQ WT *littermates* y WT suplementados con *P. distasonis* presentan niveles de células B IL-10⁺ comparables a los encontrados en ratones B1KO *single cage* tratados con IMQ, y significativamente mayores a los presentados por ratones WT *single cage* o suplementados con PBS tras la inducción de lupus. Sin embargo, la estimulación de células B *naïve* de ratones B1KO con *P. distasonis* o con CpG dio lugar a mayores frecuencias de células B productoras de IL-10 que las encontradas en células WT. Estos experimentos plantearon dos posibles hipótesis. Por un lado, es posible que, a pesar el fuerte efecto de la microbiota en la inducción del fenotipo potencialmente regulador en las células B, el fondo

genético determine en última instancia la capacidad de diferenciación de las células B. Esto se ha visto en estudios que relacionan los cambios en el metabolismo de las células B y el papel de *Bank1*, los cuales indican que menores niveles en la transcripción de este gen se asocian con un mayor estado de activación y diferenciación^{380,381}.

Sin embargo, nuestros resultados en las células B *naïve* purificadas del bazo de ratones WT y B1KO, no mostraron diferencias en los niveles de síntesis de IL-10. Por ende, se hipotetizó que las células B de las placas de Peyer, aunque *naïve*, poseen de forma basal una programación metabólica determinada por el ambiente intestinal y la microbiota asociada al genotipo B1KO. En el GALT, la regulación inmunitaria ocurre de forma diferente a la observada en localizaciones sistémicas para asegurar un estado de simbiosis entre las bacterias intestinales y el sistema inmunitario. En el intestino, y de especialmente en las placas de Peyer, las células B son expuestas a una tasa significativamente más elevada de contacto con antígenos por el íntimo contacto que mantienen con la microbiota intestinal y las células dendríticas subepiteliales¹⁷⁵. Esto, junto con la mayor concentración en el GALT de citoquinas que regulan la activación de células B, como son TGF- β o BAFF, explicaría la mayor capacidad de las células B *naïve Bank1*^{-/-} para diferenciarse hasta un fenotipo productor de IL-10³⁸².

Estos resultados, aunque prometedores, presentan aún ciertas limitaciones que, de resolverse, permitirían avanzar en la investigación del LES. Entre ellas, una de las más notables es la evaluación funcional de las células B productoras de IL-10 mediante cultivo con células T preactivadas, así como la transferencia *in vivo* de células B productoras de IL-10 hacia ratones WT con lupus.

En conjunto, se ha propuesto en este trabajo un mecanismo factible por el cual la genética podría influenciar la gravedad fenotípica del LES en un modelo murino mediado por TLR7 a través de la determinación de la composición del microbioma intestinal.

CONCLUSIONES

1. El modelo murino mediado por el incremento en la expresión de TLR7 induce manifestaciones sistémicas similares al LES en humanos y altera, a nivel intestinal, la respuesta de células B productoras de IgA y la función de la barrera intestinal.
2. Los ratones TLR7Tg presentan una microbiota diferencial al grupo WT y una respuesta sistémica frente a las bacterias intestinales que presenta, en el caso de la IgM, reactividad cruzada con autoantígenos nucleares del ADNdc.
3. La eliminación de la señalización por *Bank1* altera la respuesta inmunitaria de células B y la composición de la microbiota tanto en homeostasis como en ratones con sobreactivación de TLR7, disminuyendo la severidad del fenotipo resultante y permitiendo la colonización de *P.distasonis* en el tracto gastrointestinal.
4. Los ratones deficientes para *Bank1* presentan *in vivo* e *in vitro* mayores niveles de células B productoras de IL-10, y estas frecuencias correlacionan inversamente con la magnitud de las manifestaciones del lupus mediado por TLR7.
5. La transferencia vertical de la microbiota asociada al fenotipo *Bank1* a ratones *Bank1^{+/+}* ejerce un papel protector en el desarrollo de un modelo murino de lupus inducido por TLR7, resultando en manifestaciones sistémicas e intestinales de menor severidad y mayores niveles de células B IL-10⁺.
6. La suplementación con *P. distasonis* a ratones WT es suficiente para inducir en ellos una fenocopia de ratones B1KO tras el tratamiento con IMQ, con modificaciones de la composición global de la microbiota, la permeabilidad y respuesta inmunitaria intestinal y las frecuencias de células B productoras de IL-10.

CONCLUSIONS

1. The murine model of lupus driven by TLR7-overexpression induces systemic manifestations similar to those observed in human SLE patients and modifies the IgA-producing B cell response at the intestinal level, as well as the gut barrier function.
2. TLR7Tg mice present a differential microbiota composition when compared to WT mice and a systemic response to commensal bacteria that, for IgM antibodies, show cross-reactivity with nuclear antigens located on dsDNA.
3. The removal of *Bank1*-associated signalling alters the B cell immune response and microbiota composition in steady-state and upon TLR7 overactivation, thus reducing the resulting phenotype severity and allowing for *P. distasonis* colonization in the gastrointestinal tract.
4. *Bank1* deficient mice display higher frequencies of IL-10 producing B cells *in vivo* and *in vitro*, and those numbers inversely correlate with the magnitude of phenotypic manifestations of TLR-mediated lupus.
5. Vertical transfer of *Bank1*^{-/-}-associated microbiota composition to *Bank1*^{+/+} mice confers a protective role in the TLR7-induced murine lupus model, resulting in less severe systemic and intestinal manifestations and increased levels of IL-10⁺ B cells.
6. Supplementation with *P. distasonis* to WT mice is sufficient to induce a phenocopy of the disease manifested in B1KO upon IMQ treatment, with significant modifications in microbiota composition, gut permeability, intestinal immune response and IL-10 producing B cell frequencies.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725. doi:10.1002/art.1780400928
2. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2110-2121. doi:10.1056/NEJMra1100359
3. Yu F, Haas M, Glassock R, Zhao MH. Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(8):483-495. doi:10.1038/nrneph.2017.85
4. Banchereau R, Hong S, Cantarel B, et al. Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell.* 2016;165(3):551-565. doi:10.1016/j.cell.2016.03.008
5. Fanouriakis A, Tziolos N, Bertsias G, Boumpas DT. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2021;80(1):14-25. doi:10.1136/annrheumdis-2020-218272
6. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology.* 2019;71(9):1400-1412. doi:10.1002/art.40930
7. Yen EY, Singh RR. Brief Report: Lupus—An Unrecognized Leading Cause of Death in Young Females: A Population-Based Study Using Nationwide Death Certificates, 2000–2015. *Arthritis & Rheumatology.* 2018;70(8):1251-1255. doi:10.1002/art.40512
8. Tsang-A-Sjoe MWP, Bultink IEM. New developments in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2021;60(Supplement_6):vi21-vi28. doi:10.1093/rheumatology/keab498
9. Lazar S, Kahlenberg JM. Systemic Lupus Erythematosus: New Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Annu Rev Med.* 2023;74(1):339-352. doi:10.1146/annurev-med-043021-032611
10. Saferding V, Blüml S. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2020;110:102382. doi:10.1016/j.jaut.2019.102382
11. Brown GJ, Cañete PF, Wang H, et al. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature.* 2022;605(7909):349-356. doi:10.1038/s41586-022-04642-z

12. Li Q, Yan Y, Liu J, et al. Toll-Like Receptor 7 Activation Enhances CD8+ T Cell Effector Functions by Promoting Cellular Glycolysis. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02191
13. Murayama G, Furusawa N, Chiba A, Yamaji K, Tamura N, Miyake S. Enhanced IFN- α production is associated with increased TLR7 retention in the lysosomes of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):234. doi:10.1186/s13075-017-1441-7
14. Lee PY, Kumagai Y, Li Y, et al. TLR7-dependent and Fc γ R-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J Exp Med.* 2008;205(13):2995-3006. doi:10.1084/jem.20080462
15. Samuelsson I, Parodis I, Gunnarsson I, et al. Myocardial infarctions, subtypes and coronary atherosclerosis in SLE: a case-control study. *Lupus Sci Med.* 2021;8(1):e000515. doi:10.1136/lupus-2021-000515
16. Liu J, Zhang X, Cao X. Dendritic cells in systemic lupus erythematosus: From pathogenesis to therapeutic applications. *J Autoimmun.* 2022;132:102856. doi:10.1016/j.jaut.2022.102856
17. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med.* 2007;13(5):543-551. doi:10.1038/nm1590
18. Sakata K, Nakayamada S, Miyazaki Y, et al. Up-Regulation of TLR7-Mediated IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01957
19. Rowland SL, Riggs JM, Gilfillan S, et al. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *Journal of Experimental Medicine.* 2014;211(10):1977-1991. doi:10.1084/jem.20132620
20. Gallo PM, Rapsinski GJ, Wilson RP, et al. Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. *Immunity.* 2015;42(6):1171-1184. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.002
21. Clatworthy MR, Aronin CEP, Mathews RJ, Morgan NY, Smith KGC, Germain RN. Immune complexes stimulate CCR7-dependent dendritic cell migration to lymph nodes. *Nat Med.* 2014;20(12):1458-1463. doi:10.1038/nm.3709
22. Nie YJ, Mok MY, Chan GC, et al. Phenotypic and functional abnormalities of bone marrow-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R91. doi:10.1186/ar3018
23. Gerl V, Lischka A, Panne D, et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(7):1370-1377. doi:10.1136/ard.2009.111021

24. Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and Macrophage Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010;58(5):355-364. doi:10.1007/s00005-010-0093-y
25. Chalmers SA, Chitu V, Herlitz LC, Sahu R, Stanley ER, Putterman C. Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies. *J Autoimmun*. 2015;57:42-52. doi:10.1016/j.jaut.2014.11.007
26. Li H, Wu Q, Li J, et al. Cutting Edge: Defective Follicular Exclusion of Apoptotic Antigens Due to Marginal Zone Macrophage Defects in Autoimmune BXD2 Mice. *The Journal of Immunology*. 2013;190(9):4465-4469. doi:10.4049/jimmunol.1300041
27. Rönnblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Sci Med*. 2019;6(1):e000270. doi:10.1136/lupus-2018-000270
28. Crampton SP, Morawski PA, Bolland S. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. *Dis Model Mech*. 2014;7(9):1033-1046. doi:10.1242/dmm.016451
29. Yang S, Zhao M, Jia S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2023;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1080310
30. Triantafyllopoulou A, Franzke CW, Seshan S V, et al. Proliferative lesions and metalloproteinase activity in murine lupus nephritis mediated by type I interferons and macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(7):3012-3017. doi:10.1073/pnas.0914902107
31. Schaper F, de Leeuw K, Horst G, et al. High mobility group box 1 skews macrophage polarization and negatively influences phagocytosis of apoptotic cells. *Rheumatology*. 2016;55(12):2260-2270. doi:10.1093/rheumatology/kew324
32. Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2016;28(2):159-173. doi:10.1016/j.smim.2016.03.004
33. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, et al. A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *The Journal of Immunology*. 2010;184(6):3284-3297. doi:10.4049/jimmunol.0902199
34. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73). doi:10.1126/scitranslmed.3001201
35. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA–Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3(73). doi:10.1126/scitranslmed.3001180
36. Matzinger P. The evolution of the danger theory. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(4):311-317. doi:10.1586/eci.12.21

37. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(5):281-294. doi:10.1038/nri.2017.19
38. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):160-171. doi:10.1038/nri3795
39. Wellmann U, Letz M, Herrmann M, Angermüller S, Kalden JR, Winkler TH. The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102(26):9258-9263. doi:10.1073/pnas.0500132102
40. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):845-857. doi:10.1038/nri2637
41. Arkatkar T, Du SW, Jacobs HM, et al. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine.* 2017;214(11):3207-3217. doi:10.1084/jem.20170580
42. Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, et al. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1959-1971. doi:10.1084/jem.20062567
43. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ. Evolution of Autoantibody Responses via Somatic Hypermutation Outside of Germinal Centers. *Science (1979).* 2002;297(5589):2066-2070. doi:10.1126/science.1073924
44. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):282-294. doi:10.1038/nri3190
45. Yasuda K, Richez C, Maciaszek JW, et al. Murine Dendritic Cell Type I IFN Production Induced by Human IgG-RNA Immune Complexes Is IFN Regulatory Factor (IRF)5 and IRF7 Dependent and Is Required for IL-6 Production. *The Journal of Immunology.* 2007;178(11):6876-6885. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6876
46. Wallace CH, Wu BX, Salem M, et al. B lymphocytes confer immune tolerance via cell surface GARP-TGF- β complex. *JCI Insight.* 2018;3(7). doi:10.1172/jci.insight.99863
47. Canny SP, Jackson SW. B Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 2021;47(3):395-413. doi:10.1016/j.rdc.2021.04.006
48. An N, Chen Y, Wang C, et al. Chloroquine Autophagic Inhibition Rebalances Th17/Treg-Mediated Immunity and Ameliorates Systemic Lupus Erythematosus. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;44(1):412-422. doi:10.1159/000484955
49. Dam EM, Habib T, Chen J, et al. The BANK1 SLE-risk variants are associated with alterations in peripheral B cell signaling and development in humans. *Clinical Immunology.* 2016;173:171-180. doi:10.1016/j.clim.2016.10.018
50. Mackay M, Stanevsky A, Wang T, et al. Selective dysregulation of the Fc γ IIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med.* 2006;203(9):2157-2164. doi:10.1084/jem.20051503

51. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* (1979). 2009;325(5943):1006-1010. doi:10.1126/science.1175870
52. Choi J, Ho JH, Pasoto SG, et al. Circulating Follicular Helper–Like T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Association With Disease Activity. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(4):988-999. doi:10.1002/art.39020
53. Li H, Boulougoura A, Endo Y, Tsokos GC. Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus: new insights in pathogenesis and therapeutic strategies. *J Autoimmun*. 2022;132:102870. doi:10.1016/j.jaut.2022.102870
54. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *The Journal of Immunology*. 2008;181(12):8761-8766. doi:10.4049/jimmunol.181.12.8761
55. Hsu HC, Yang P, Wang J, et al. Interleukin 17–producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol*. 2008;9(2):166-175. doi:10.1038/ni1552
56. Comte D, Karampetsou MP, Yoshida N, Kis-Toth K, Kyttaris VC, Tsokos GC. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 Engagement Restores Defective Effector CD8+ T Cell Function in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(5):1035-1044. doi:10.1002/art.40038
57. Lou H, Ling GS, Cao X. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: From immunopathology to therapeutic target. *J Autoimmun*. 2022;132:102861. doi:10.1016/j.jaut.2022.102861
58. Webb R, Kelly JA, Somers EC, et al. Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):151-156. doi:10.1136/ard.2010.141697
59. Charras A, Smith E, Hedrich CM. Systemic Lupus Erythematosus in Children and Young People. *Curr Rheumatol Rep*. 2021;23(3):20. doi:10.1007/s11926-021-00985-0
60. Smith CD, Cyr M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am*. 1988;14(1):1-14.
61. Xie L, Lopes Almeida Gomes L, Stone CJ, Faden DF, Werth VP. An update on clinical trials for cutaneous lupus erythematosus. *J Dermatol*. 2024;51(7):885-894. doi:10.1111/1346-8138.17161
62. Alforaih N, Whittall-Garcia L, Touma Z. A Review of Lupus Nephritis. *J Appl Lab Med*. 2022;7(6):1450-1467. doi:10.1093/jalm/jfac036
63. Arazi A, Rao DA, Berthier CC, et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis. *Nat Immunol*. 2019;20(7):902-914. doi:10.1038/s41590-019-0398-x

64. Kopetschke K, Klocke J, Griebßbach AS, et al. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: new insights into potential biomarkers. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):94. doi:10.1186/s13075-015-0600-y
65. Yu C, Li P, Dang X, Zhang X, Mao Y, Chen X. Lupus nephritis: new progress in diagnosis and treatment. *J Autoimmun.* 2022;132:102871. doi:10.1016/j.jaut.2022.102871
66. Birmingham DJ, Hebert LA. The Complement System in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol.* 2015;35(5):444-454. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.08.006
67. Tian XP, Zhang X. Gastrointestinal involvement in systemic lupus erythematosus: insight into pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2010;16(24):2971-2977. doi:10.3748/wjg.v16.i24.2971
68. Gunawan M, Her Z, Liu M, et al. A Novel Human Systemic Lupus Erythematosus Model in Humanised Mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):16642. doi:10.1038/s41598-017-16999-7
69. Ponticelli C, Moroni G. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE). *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(3):411-419. doi:10.1080/14740338.2017.1269168
70. Porta S, Danza A, Arias Saavedra M, et al. Glucocorticoids in Systemic Lupus Erythematosus. Ten Questions and Some Issues. *J Clin Med.* 2020;9(9):2709. doi:10.3390/jcm9092709
71. Luijten RKM, Fritsch-Stork RD, Bijlsma JWJ, Derksen RHW. The use of glucocorticoids in Systemic Lupus Erythematosus. After 60years still more an art than science. *Autoimmun Rev.* 2013;12(5):617-628. doi:10.1016/j.autrev.2012.12.001
72. Blair HA, Duggan ST. Belimumab: A Review in Systemic Lupus Erythematosus. *Drugs.* 2018;78(3):355-366. doi:10.1007/s40265-018-0872-z
73. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, 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):222-233. doi:10.1002/art.27233
74. Frampton JE. Inebilizumab: First Approval. *Drugs.* 2020;80(12):1259-1264. doi:10.1007/s40265-020-01370-4
75. Ameer MA, Chaudhry H, Mushtaq J, et al. An Overview of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Pathogenesis, Classification, and Management. *Cureus.* Published online October 15, 2022. doi:10.7759/cureus.30330
76. Golder V, Tsang-A-Sjoe MWP. Treatment targets in SLE: remission and low disease activity state. *Rheumatology.* 2020;59(Supplement_5):v19-v28. doi:10.1093/rheumatology/keaa420

77. Aringer M, Alarcón-Riquelme ME, Clowse M, Pons-Estel GJ, Vital EM, Dall’Era M. A glimpse into the future of systemic lupus erythematosus. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2022;14:1759720X2210867. doi:10.1177/1759720X221086719
78. Deeks ED. Anifrolumab: First Approval. *Drugs*. 2021;81(15):1795-1802. doi:10.1007/s40265-021-01604-z
79. Saxena A, Ginzler EM, Gibson K, et al. Safety and Efficacy of <scp>Long-Term</scp> Voclosporin Treatment for Lupus Nephritis in the Phase 3 <scp>AURORA</scp> 2 Clinical Trial. *Arthritis & Rheumatology*. 2024;76(1):59-67. doi:10.1002/art.42657
80. Accapezzato D, Caccavale R, Paroli MP, et al. Advances in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6578. doi:10.3390/ijms24076578
81. Hiepe F, Dörner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H, Radbruch A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(3):170-178. doi:10.1038/nrrheum.2011.1
82. Mumtaz IM, Hoyer BF, Panne D, et al. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: implications for the treatment of autoimmunity. *J Autoimmun*. 2012;39(3):180-188. doi:10.1016/j.jaut.2012.05.010
83. Parodis I, Gomez A, Lindblom J, et al. B Cell Kinetics upon Therapy Commencement for Active Extrarenal Systemic Lupus Erythematosus in Relation to Development of Renal Flares: Results from Three Phase III Clinical Trials of Belimumab. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22). doi:10.3390/ijms232213941
84. McHugh MD, Park J, Uhrich R, Gao W, Horwitz DA, Fahmy TM. Paracrine co-delivery of TGF- β and IL-2 using CD4-targeted nanoparticles for induction and maintenance of regulatory T cells. *Biomaterials*. 2015;59:172-181. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.003
85. Horwitz DA, Bickerton S, Koss M, Fahmy TM, La Cava A. Suppression of Murine Lupus by <scp>CD</scp> 4+ and <scp>CD</scp> 8+ Treg Cells Induced by T Cell-Targeted Nanoparticles Loaded With Interleukin-2 and Transforming Growth Factor β . *Arthritis & Rheumatology*. 2019;71(4):632-640. doi:10.1002/art.40773
86. Eisenberg R. Why can't we find a new treatment for SLE? *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):223-230. doi:10.1016/j.jaut.2009.02.006
87. STEINBERG AD. Systemic Lupus Erythematosus: Insights from Animal Models. *Ann Intern Med*. 1984;100(5):714. doi:10.7326/0003-4819-100-5-714
88. Gunawan M, Her Z, Liu M, et al. A Novel Human Systemic Lupus Erythematosus Model in Humanised Mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):16642. doi:10.1038/s41598-017-16999-7

89. Chen J, Liao S, Zhou H, et al. Humanized Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus: Opportunities and Challenges. *Front Immunol.* 2022;12. doi:10.3389/fimmu.2021.816956
90. 'Bielschowsky M, 'Helyer B, 'Howie J. Spontaneous Hemolytic Anemia in Mice of the NZB/BL Strain. *Proc Univ Otago Med Sch.* 1959;37:9-11.
91. Yoshida S, Castles JJ, Gershwin ME. The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice. *Semin Arthritis Rheum.* 1990;19(4):224-242. doi:10.1016/0049-0172(90)90002-W
92. Dixon FJ, Andrews BS, Eisenberg RA, McConahey PJ, Theofilopoulos AN, Wilson CB. Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. *Arthritis Rheum.* 1978;21(S1):S64-S67. doi:10.1002/art.1780210909
93. Morel L, Rudofsky UH, Longmate JA, Schiffenbauer J, Wakeland EK. Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 1994;1(3):219-229. doi:10.1016/1074-7613(94)90100-7
94. Halkom A, Wu H, Lu Q. Contribution of mouse models in our understanding of lupus. *Int Rev Immunol.* 2020;39(4):174-187. doi:10.1080/08830185.2020.1742712
95. Morel L, Blenman KR, Croker BP, Wakeland EK. The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, *Sle1*, is a cluster of functionally related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98(4):1787-1792. doi:10.1073/pnas.98.4.1787
96. Waters ST, McDuffie M, Bagavant H, et al. Breaking Tolerance to Double Stranded DNA, Nucleosome, and Other Nuclear Antigens Is Not Required for the Pathogenesis of Lupus Glomerulonephritis. *J Exp Med.* 2004;199(2):255-264. doi:10.1084/jem.20031519
97. Zhu J, Liu X, Xie C, et al. T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells. *Journal of Clinical Investigation.* 2005;115(7):1869-1878. doi:10.1172/JCI23049
98. Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993;90(5):1756-1760. doi:10.1073/pnas.90.5.1756
99. Dixon FJ, Andrews BS, Eisenberg RA, McConahey PJ, Theofilopoulos AN, Wilson CB. Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. *Arthritis Rheum.* 1978;21(S1):S64-S67. doi:10.1002/art.1780210909
100. Rodríguez-Rodríguez N, Apostolidis SA, Fitzgerald L, et al. Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ + CD4 - CD8 - PD-1 + cells. *Eur J Immunol.* 2016;46(6):1383-1391. doi:10.1002/eji.201546056

101. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *The Journal of Immunology*. 2008;181(12):8761-8766. doi:10.4049/jimmunol.181.12.8761
102. Murphy ED, Roths JB. A y chromosome associated factor in strain bxs_b producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. *Arthritis Rheum*. 1979;22(11):1188-1194. doi:10.1002/art.1780221105
103. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. 1978;148(5):1198-1215. doi:10.1084/jem.148.5.1198
104. Halkom A, Wu H, Lu Q. Contribution of mouse models in our understanding of lupus. *Int Rev Immunol*. 2020;39(4):174-187. doi:10.1080/08830185.2020.1742712
105. Subramanian S, Tus K, Li QZ, et al. A *Tlr7* translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(26):9970-9975. doi:10.1073/pnas.0603912103
106. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, et al. Control of Toll-like Receptor 7 Expression Is Essential to Restrict Autoimmunity and Dendritic Cell Proliferation. *Immunity*. 2007;27(5):801-810. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.009
107. von Hofsten S, Fenton KA, Pedersen HL. Human and Murine Toll-like Receptor-Driven Disease in Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*. 2024;25(10):5351. doi:10.3390/ijms25105351
108. Gleichmann E, Gleichmann H. Pathogenesis of Graft-Versus-Host Reactions (GVHR) and GVH-like Diseases. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985;85(1):S115-S120. doi:10.1111/1523-1747.ep12275619
109. MacDonald KPA, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-21. doi:10.1182/blood-2016-06-686618
110. Satoh M, Reeves WH. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med*. 1994;180(6):2341-2346. doi:10.1084/jem.180.6.2341
111. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol*. 2009;30(9):455-464. doi:10.1016/j.it.2009.06.003
112. Tsao YP, Tseng FY, Chao CW, et al. NLRP12 is an innate immune checkpoint for repressing IFN signatures and attenuating lupus nephritis progression. *Journal of Clinical Investigation*. 2023;133(3). doi:10.1172/JCI157272
113. Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, et al. Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads to Systemic Autoimmunity in Wild-Type Mice: A New Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(3):694-706. doi:10.1002/art.38298

114. Kalechman Y, Gafter U, Da JP, Albeck M, Alarcon-Segovia D, Sredni B. Delay in the onset of systemic lupus erythematosus following treatment with the immunomodulator AS101: association with IL-10 inhibition and increase in TNF-alpha levels. *J Immunol.* 1997;159(6):2658-2667.
115. Duchosal MA, McConahey PJ, Robinson CA, Dixon FJ. Transfer of human systemic lupus erythematosus in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Exp Med.* 1990;172(3):985-988. doi:10.1084/jem.172.3.985
116. Kerekov N, Mihaylova N, Prechl J, Tchorbanov A. Humanized SCID Mice Models of SLE. *Curr Pharm Des.* 2011;17(13):1261-1266. doi:10.2174/138161211795703780
117. Andrade D, Redecha PB, Vukelic M, et al. Engraftment of peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome patient donors into BALB-RAG-2 $-/-$ IL-2R γ $-/-$ mice: A promising model for studying human disease. *Arthritis Rheum.* 2011;63(9):2764-2773. doi:10.1002/art.30424
118. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature.* 1988;335(6187):256-259. doi:10.1038/335256a0
119. King M, Pearson T, Shultz LD, et al. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clinical Immunology.* 2008;126(3):303-314. doi:10.1016/j.clim.2007.11.001
120. Wen Z, Xu L, Xu W, Xiong S. Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor γ Licenses the Differentiation and Function of a Unique Subset of Follicular Helper T Cells in Response to Immunogenic Self-DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology.* 2021;73(8):1489-1500. doi:10.1002/art.41687
121. CAVACINI LA, KENNEL M, LALLY E V, POSNER MR, QUINN A. Human immunoglobulin production in immunodeficient mice: enhancement by immunosuppression of host and *in vitro* activation of human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 2008;90(1):135-140. doi:10.1111/j.1365-2249.1992.tb05845.x
122. Ruff WE, Greiling TM, Kriegel MA. Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(9):521-538. doi:10.1038/s41579-020-0367-2
123. Crampton SP, Morawski PA, Bolland S. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. *Dis Model Mech.* 2014;7(9):1033-1046. doi:10.1242/dmm.016451
124. Alperin JM, Ortiz-Fernández L, Sawalha AH. Monogenic Lupus: A Developing Paradigm of Disease. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02496

125. Qin Y, Ma J, Vinuesa CG. Monogenic lupus: insights into disease pathogenesis and therapeutic opportunities. *Curr Opin Rheumatol*. 2024;36(3):191-200. doi:10.1097/BOR.0000000000001008
126. Gómez Hernández G, Morell M, Alarcón-Riquelme ME. The Role of BANK1 in B Cell Signaling and Disease. *Cells*. 2021;10(5):1184. doi:10.3390/cells10051184
127. Orozco G, Eyre S, Hinks A, et al. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):463-468. doi:10.1136/ard.2010.137174
128. Berndt SI, Camp NJ, Skibola CF, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*. 2016;7(1):10933. doi:10.1038/ncomms10933
129. Chen Y, Wu Q, Shao Y, et al. Identify the association between polymorphisms of BLK and systemic lupus erythematosus through unlabelled probe-based high-resolution melting analysis. *Int J Immunogenet*. 2012;39(4):321-327. doi:10.1111/j.1744-313X.2012.01094.x
130. Zhang Z, Zhu KJ, Xu Q, et al. The association of the BLK gene with SLE was replicated in Chinese Han. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(8):619-624. doi:10.1007/s00403-010-1029-4
131. Qian J, Chen Y, Yang X, et al. Association Study Identified *HLA-DQA1* as a Novel Genetic Risk of Systemic Lupus Erythematosus-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis & Rheumatology*. 2023;75(12):2207-2215. doi:10.1002/art.42641
132. González-Escribano MF, Aguilar F, Torres B, Sánchez-Román J, Núñez-Roldán A. CD38 polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2004;65(6):660-664. doi:10.1016/j.humimm.2004.02.032
133. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, et al. TLR7 single-nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region and intron 2 independently contribute to systemic lupus erythematosus in Japanese women: a case-control association study. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):R41. doi:10.1186/ar3277
134. Troutman TD, Hu W, Fulenchek S, et al. Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(1):273-278. doi:10.1073/pnas.1118579109
135. Kozyrev S V, Abelson AK, Wojcik J, et al. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008;40(2):211-216. doi:10.1038/ng.79
136. Suarez-Gestal M, Calaza M, Endreffy E, et al. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R69. doi:10.1186/ar2698

137. Martínez-Bueno M, Oparina N, Dozmorov MG, et al. Trans-Ethnic Mapping of BANK1 Identifies Two Independent SLE-Risk Linkage Groups Enriched for Co-Transcriptional Splicing Marks. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2331. doi:10.3390/ijms19082331
138. Chang YK, Yang W, Zhao M, et al. Association of BANK1 and TNFSF4 with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese. *Genes Immun.* 2009;10(5):414-420. doi:10.1038/gene.2009.16
139. Yang W, Shen N, Ye DQ, et al. Genome-Wide Association Study in Asian Populations Identifies Variants in ETS1 and WDFY4 Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS Genet.* 2010;6(2):e1000841. doi:10.1371/journal.pgen.1000841
140. Chung SA, Tian C, Taylor KE, et al. European population substructure is associated with mucocutaneous manifestations and autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60(8):2448-2456. doi:10.1002/art.24707
141. Georg I, Díaz-Barreiro A, Morell M, Pey AL, Alarcón-Riquelme ME. BANK1 interacts with TRAF6 and MyD88 in innate immune signaling in B cells. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(9):954-965. doi:10.1038/s41423-019-0254-9
142. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, et al. Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol.* 2004;5(10):1061-1068. doi:10.1038/ni1118
143. Berndt SI, Camp NJ, Skibola CF, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun.* 2016;7(1):10933. doi:10.1038/ncomms10933
144. Orozco G, Abelson A, González-Gay MA, et al. Study of functional variants of the BANK1 gene in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):372-379. doi:10.1002/art.24244
145. Dieudé P, Wipff J, Guedj M, et al. BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3447-3454. doi:10.1002/art.24885
146. Yokoyama K. BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP3 receptor. *EMBO J.* 2002;21(1):83-92. doi:10.1093/emboj/21.1.83
147. Wang D, Feng J, Wen R, et al. Phospholipase C γ 2 Is Essential in the Functions of B Cell and Several Fc Receptors. *Immunity.* 2000;13(1):25-35. doi:10.1016/S1074-7613(00)00005-4
148. Wu YY, Kumar R, Haque MS, Castillejo-López C, Alarcón-Riquelme ME. BANK1 Controls CpG-Induced IL-6 Secretion via a p38 and MNK1/2/eIF4E Translation Initiation Pathway. *The Journal of Immunology.* 2013;191(12):6110-6116. doi:10.4049/jimmunol.1301203

149. Wu YY, Kumar R, Iida R, Bagavant H, Alarcón-Riquelme ME. BANK1 Regulates IgG Production in a Lupus Model by Controlling TLR7-Dependent STAT1 Activation. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156302. doi:10.1371/journal.pone.0156302
150. Aiba Y, Yamazaki T, Okada T, et al. BANK Negatively Regulates Akt Activation and Subsequent B Cell Responses. *Immunity*. 2006;24(3):259-268. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.002
151. Dam EM, Habib T, Chen J, et al. The BANK1 SLE-risk variants are associated with alterations in peripheral B cell signaling and development in humans. *Clinical Immunology*. 2016;173:171-180. doi:10.1016/j.clim.2016.10.018
152. Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ. Inhibition of Toll-Like Receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 Attenuates Glomerulonephritis and Lung Injury in Experimental Lupus. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(6):1721-1731. doi:10.1681/ASN.2006101162
153. Barrat FJ, Meeker T, Chan JH, Guiducci C, Coffman RL. Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol*. 2007;37(12):3582-3586. doi:10.1002/eji.200737815
154. Fairhurst A, Hwang S, Wang A, et al. *Yaa* autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol*. 2008;38(7):1971-1978. doi:10.1002/eji.200838138
155. Hwang SH, Lee H, Yamamoto M, et al. B Cell TLR7 Expression Drives Anti-RNA Autoantibody Production and Exacerbates Disease in Systemic Lupus Erythematosus-Prone Mice. *The Journal of Immunology*. 2012;189(12):5786-5796. doi:10.4049/jimmunol.1202195
156. Kelley J, Johnson MR, Alarcón GS, Kimberly RP, Edberg JC. Variation in the relative copy number of the *TLR7* gene in patients with systemic lupus erythematosus and healthy control subjects. *Arthritis Rheum*. 2007;56(10):3375-3378. doi:10.1002/art.22916
157. Garcia-Ortiz H, Velazquez-Cruz R, Espinosa-Rosales F, Jimenez-Morales S, Baca V, Orozco L. Association of TLR7 copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(10):1861-1865. doi:10.1136/ard.2009.124313
158. Brown GJ, Cañete PF, Wang H, et al. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature*. 2022;605(7909):349-356. doi:10.1038/s41586-022-04642-z
159. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science (1979)*. 2003;301(5638):1374-1377. doi:10.1126/science.1086907

160. Anesi N, Miquel CH, Laffont S, Guéry JC. The Influence of Sex Hormones and X Chromosome in Immune Responses. In: ; 2023:21-59. doi:10.1007/978-3-031-35139-6_2
161. Pauklin S, Sernández I V, Bachmann G, Ramiro AR, Petersen-Mahrt SK. Estrogen directly activates AID transcription and function. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(1):99-111. doi:10.1084/jem.20080521
162. Zhao R, Chen X, Ma W, et al. A GPR174–CCL21 module imparts sexual dimorphism to humoral immunity. *Nature*. 2020;577(7790):416-420. doi:10.1038/s41586-019-1873-0
163. Griesbeck M, Ziegler S, Laffont S, et al. Sex Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Levels of IRF5 Drive Higher IFN- α Production in Women. *The Journal of Immunology*. 2015;195(11):5327-5336. doi:10.4049/jimmunol.1501684
164. Liu K, Kurien BT, Zimmerman SL, et al. X Chromosome Dose and Sex Bias in Autoimmune Diseases: Increased Prevalence of 47,XXX in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(5):1290-1300. doi:10.1002/art.39560
165. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005;434(7031):400-404. doi:10.1038/nature03479
166. Scofield RH, Bruner GR, Namjou B, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: Support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2511-2517. doi:10.1002/art.23701
167. Fanouriakis A, Tziolos N, Bertsias G, Boumpas DT. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2021;80(1):14-25. doi:10.1136/annrheumdis-2020-218272
168. Bertsias GK, Salmon JE, Boumpas DT. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1603-1611. doi:10.1136/ard.2010.135186
169. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65. doi:10.1038/nature08821
170. Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol*. 2017;3(1):8-16. doi:10.1038/s41564-017-0072-8
171. Ruff WE, Greiling TM, Kriegel MA. Host–microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(9):521-538. doi:10.1038/s41579-020-0367-2
172. Osman MA, Neoh H min, Ab Mutalib NS, Chin SE, Jamal R. 16S rRNA Gene Sequencing for Deciphering the Colorectal Cancer Gut Microbiome: Current Protocols and Workflows. *Front Microbiol*. 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.00767

173. Mestre L, Carrillo-Salinas FJ, Mecha M, et al. Manipulation of Gut Microbiota Influences Immune Responses, Axon Preservation, and Motor Disability in a Model of Progressive Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:1374. doi:10.3389/fimmu.2019.01374
174. Lee JY, Mannaa M, Kim Y, Kim J, Kim GT, Seo YS. Comparative Analysis of Fecal Microbiota Composition Between Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Patients. *Genes (Basel).* 2019;10(10). doi:10.3390/genes10100748
175. Botía-Sánchez M, Alarcón-Riquelme ME, Galicia G. B Cells and Microbiota in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9). doi:10.3390/ijms22094846
176. Lu R, Luo XM. The role of gut microbiota in different murine models of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2024;57(1). doi:10.1080/08916934.2024.2378876
177. Manfredo Vieira S, Hiltensperger M, Kumar V, et al. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science (1979).* 2018;359(6380):1156-1161. doi:10.1126/science.aar7201
178. Zegarra-Ruiz DF, El Beidaq A, Iñiguez AJ, et al. A Diet-Sensitive Commensal Lactobacillus Strain Mediates TLR7-Dependent Systemic Autoimmunity. *Cell Host Microbe.* 2019;25(1):113-127.e6. doi:10.1016/j.chom.2018.11.009
179. Choi SC, Brown J, Gong M, et al. Gut microbiota dysbiosis and altered tryptophan catabolism contribute to autoimmunity in lupus-susceptible mice. *Sci Transl Med.* 2020;12(551). doi:10.1126/scitranslmed.aax2220
180. Ma Y, Guo R, Sun Y, et al. Lupus gut microbiota transplants cause autoimmunity and inflammation. *Clinical Immunology.* 2021;233:108892. doi:10.1016/j.clim.2021.108892
181. Vogelzang A, Guerrini MM, Minato N, Fagarasan S. Microbiota — an amplifier of autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2018;55:15-21. doi:10.1016/j.coi.2018.09.003
182. Mu Q, Edwards MR, Swartwout BK, et al. Gut Microbiota and Bacterial DNA Suppress Autoimmunity by Stimulating Regulatory B Cells in a Murine Model of Lupus. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.593353
183. Luo XM, Edwards MR, Mu Q, et al. Gut Microbiota in Human Systemic Lupus Erythematosus and a Mouse Model of Lupus. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(4). doi:10.1128/AEM.02288-17
184. Zimmermann J, Kühl AA, Weber M, et al. T-bet expression by Th cells promotes type 1 inflammation but is dispensable for colitis. *Mucosal Immunol.* 2016;9(6):1487-1499. doi:10.1038/mi.2016.5
185. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, et al. The Transcription Factor T-bet Regulates Mucosal T Cell Activation in Experimental Colitis and Crohn's Disease. *J Exp Med.* 2002;195(9):1129-1143. doi:10.1084/jem.20011956

186. Krausgruber T, Schiering C, Adelman K, et al. T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4+ T cell responses in the intestine. *Nat Commun*. 2016;7(1):11627. doi:10.1038/ncomms11627
187. Zimmermann J, Durek P, Kühl AA, et al. The intestinal microbiota determines the colitis-inducing potential of T-bet-deficient Th cells in mice. *Eur J Immunol*. 2018;48(1):161-167. doi:10.1002/eji.201747100
188. Elinav E, Strowig T, Kau AL, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011;145(5):745-757. doi:10.1016/j.cell.2011.04.022
189. Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, et al. Commensal Bacteroides species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):390-403. doi:10.1016/j.chom.2011.04.009
190. Hevia A, Milani C, López P, et al. Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *mBio*. 2014;5(5). doi:10.1128/mBio.01548-14
191. Kim CH. Complex regulatory effects of gut microbial short-chain fatty acids on immune tolerance and autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 2023;20(4):341-350. doi:10.1038/s41423-023-00987-1
192. Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):202-214. doi:10.1016/j.chom.2016.07.001
193. Dodd D, Spitzer MH, Van Treuren W, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature*. 2017;551(7682):648-652. doi:10.1038/nature24661
194. Greiling TM, Dehner C, Chen X, et al. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. *Sci Transl Med*. 2018;10(434). doi:10.1126/scitranslmed.aan2306
195. Avni O, Koren O. Molecular (Me)micry? *Cell Host Microbe*. 2018;23(5):576-578. doi:10.1016/j.chom.2018.04.012
196. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369). doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921
197. Song W, Wu F, Yan Y, et al. Gut microbiota landscape and potential biomarker identification in female patients with systemic lupus erythematosus using machine learning. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1289124
198. Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J*. 2017;11(4):841-852. doi:10.1038/ismej.2016.176
199. Goma EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020;113(12):2019-2040. doi:10.1007/s10482-020-01474-7

200. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1):14. doi:10.3390/microorganisms7010014
201. Lugli GA, Milani C, Duranti S, et al. Isolation of novel gut bifidobacteria using a combination of metagenomic and cultivation approaches. *Genome Biol*. 2019;20(1):96. doi:10.1186/s13059-019-1711-6
202. Gavzy SJ, Kensiski A, Lee ZL, Mongodin EF, Ma B, Bromberg JS. *Bifidobacterium* mechanisms of immune modulation and tolerance. *Gut Microbes*. 2023;15(2). doi:10.1080/19490976.2023.2291164
203. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*. 2015;161(2):264-276. doi:10.1016/j.cell.2015.02.047
204. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041
205. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab*. 2016;24(1):41-50. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.005
206. Sheikh IA, Bianchi-Smak J, Laubitz D, et al. Transplant of microbiota from Crohn's disease patients to germ-free mice results in colitis. *Gut Microbes*. 2024;16(1). doi:10.1080/19490976.2024.2333483
207. Props R, Kerckhof FM, Rubbens P, et al. Absolute quantification of microbial taxon abundances. *ISME J*. 2017;11(2):584-587. doi:10.1038/ismej.2016.117
208. Sanschagrín S, Yergeau E. Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;(90). doi:10.3791/51709
209. Lozupone CA, Stombaugh J, Gonzalez A, et al. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Res*. 2013;23(10):1704-1714. doi:10.1101/gr.151803.112
210. Joseph TA, Pèr I. An Introduction to Whole-Metagenome Shotgun Sequencing Studies. In: ; 2021:107-122. doi:10.1007/978-1-0716-1103-6_6
211. Props R, Monsieus P, Mysara M, Clement L, Boon N. Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. *Methods Ecol Evol*. 2016;7(11):1376-1385. doi:10.1111/2041-210X.12607
212. van Dorst J, Bissett A, Palmer AS, et al. Community fingerprinting in a sequencing world. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;89(2):316-330. doi:10.1111/1574-6941.12308
213. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*. 2012;13(1):47-58. doi:10.1038/nrg3129

214. Soergel DAW, Dey N, Knight R, Brenner SE. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* 2012;6(7):1440-1444. doi:10.1038/ismej.2011.208
215. Schmiester M, Maier R, Riedel R, et al. Flow cytometry can reliably capture gut microbial composition in healthy adults as well as dysbiosis dynamics in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Gut Microbes.* 2022;14(1). doi:10.1080/19490976.2022.2081475
216. Kupschus J, Janssen S, Hoek A, et al. Rapid detection and online analysis of microbial changes through flow cytometry. *Cytometry Part A.* 2023;103(5):419-428. doi:10.1002/cyto.a.24704
217. Budzinski L, Radbruch A, Chang HD. Single-cell multi-parametric characterization of microbiota by flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 2024;186:91-106. doi:10.1016/bs.mcb.2024.02.023
218. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell.* 2016;165(6):1551. doi:10.1016/j.cell.2016.05.056
219. Huang C, Yue Q, Sun L, et al. Restorative effects of *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 on the gut microbiota, barrier integrity, and 5-HT metabolism in reducing feather-pecking behavior in laying hens with antibiotic-induced dysbiosis. *Front Microbiol.* 2023;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1173804
220. Yang Y, Du H, Pan Y, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. LKM512 Alleviates Inflammatory Bowel Disease in Larval Zebrafish by Reshaping Microbiota. *Biol Pharm Bull.* 2023;46(12):b23-00406. doi:10.1248/bpb.b23-00406
221. Baldassarre ME, Marazzato M, Pensa M, et al. SLAB51 Multi-Strain Probiotic Formula Increases Oxygenation in Oxygen-Treated Preterm Infants. *Nutrients.* 2023;15(17):3685. doi:10.3390/nu15173685
222. Baunwall SMD, Terveer EM, Dahlerup JF, et al. The use of Faecal Microbiota Transplantation (FMT) in Europe: A Europe-wide survey. *The Lancet Regional Health - Europe.* 2021;9:100181. doi:10.1016/j.lanep.2021.100181
223. Sood A, Singh A, Midha V, et al. Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: An Evolving Therapy. *Crohns Colitis* 360. 2020;2(4). doi:10.1093/crocol/otaa067
224. Lahtinen P, Jalanka J, Mattila E, et al. Fecal microbiota transplantation for the maintenance of remission in patients with ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *World J Gastroenterol.* 2023;29(17):2666-2678. doi:10.3748/wjg.v29.i17.2666
225. Eberl G, Vieira P. Beware of whom you live with: Your intestinal IgA may depend on it. *Eur J Immunol.* 2020;50(6):779-782. doi:10.1002/eji.202048615

226. Li D, Sun T, Tong Y, et al. Gut-microbiome-expressed 3β -hydroxysteroid dehydrogenase degrades estradiol and is linked to depression in premenopausal females. *Cell Metab.* 2023;35(4):685-694.e5. doi:10.1016/j.cmet.2023.02.017
227. Sanidad KZ, Rager SL, Carrow HC, et al. Gut bacteria-derived serotonin promotes immune tolerance in early life. *Sci Immunol.* 2024;9(93). doi:10.1126/sciimmunol.adj4775
228. Radaelli E, Santagostino SF, Sellers RS, Brayton CF. Immune Relevant and Immune Deficient Mice: Options and Opportunities in Translational Research. *ILAR J.* 2018;59(3):211-246. doi:10.1093/ilar/ily026
229. Pantoja-Feliciano IG, Clemente JC, Costello EK, et al. Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *ISME J.* 2013;7(6):1112-1115. doi:10.1038/ismej.2013.15
230. Robertson SJ, Lemire P, Maughan H, et al. Comparison of Co-housing and Littermate Methods for Microbiota Standardization in Mouse Models. *Cell Rep.* 2019;27(6):1910-1919.e2. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.023
231. Neff EP. Littermate wanted: standardizing mouse gut microbiota requires more than cohousing. *Lab Anim (NY).* 2019;48(7):197-197. doi:10.1038/s41684-019-0336-4
232. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature.* 2011;478(7368):250-254. doi:10.1038/nature10434
233. Cebula A, Seweryn M, Rempala GA, et al. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature.* 2013;497(7448):258-262. doi:10.1038/nature12079
234. Delecluse S, Tsai MH, Shumilov A, et al. Epstein-Barr Virus Induces Expression of the LPAM-1 Integrin in B Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *J Virol.* 2019;93(5). doi:10.1128/JVI.01618-18
235. Beller A, Kruglov A, Durek P, et al. Specific microbiota enhances intestinal IgA levels by inducing TGF- β in T follicular helper cells of Peyer's patches in mice. *Eur J Immunol.* 2020;50(6):783-794. doi:10.1002/eji.201948474
236. Gribonika I, Eliasson DG, Chandode RK, et al. Class-switch recombination to IgA in the Peyer's patches requires natural thymus-derived Tregs and appears to be antigen independent. *Mucosal Immunol.* 2019;12(6):1268-1279. doi:10.1038/s41385-019-0202-0
237. Chen H, Zhang Y, Ye AY, et al. BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. *Nature.* 2020;582(7812):421-425. doi:10.1038/s41586-020-2262-4
238. Fenton TM, Jørgensen PB, Niss K, et al. Immune Profiling of Human Gut-Associated Lymphoid Tissue Identifies a Role for Isolated Lymphoid Follicles in Priming of Region-Specific Immunity. *Immunity.* 2020;52(3):557-570.e6. doi:10.1016/j.immuni.2020.02.001

239. Nagashima K, Sawa S, Nitta T, et al. Targeted deletion of RANKL in M cell inducer cells by the Col6a1-Cre driver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(1):437-443. doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.004
240. Voedisch S, Koenecke C, David S, et al. Mesenteric Lymph Nodes Confine Dendritic Cell-Mediated Dissemination of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Limit Systemic Disease in Mice. *Infect Immun.* 2009;77(8):3170-3180. doi:10.1128/IAI.00272-09
241. Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AMcI. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* 2011;32(9):412-419. doi:10.1016/j.it.2011.06.003
242. Shiokawa A, Kotaki R, Takano T, Nakajima-Adachi H, Hachimura S. Mesenteric lymph node CD11b – CD103 + PD-L1 High dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology.* 2017;152(1):52-64. doi:10.1111/imm.12747
243. Craig SW, Cebra JJ. PEYER'S PATCHES: AN ENRICHED SOURCE OF PRECURSORS FOR I α -PRODUCING IMMUNOCYTES IN THE RABBIT. *J Exp Med.* 1971;134(1):188-200. doi:10.1084/jem.134.1.188
244. Kruglov AA, Grivennikov SI, Kuprash D V., et al. Nonredundant Function of Soluble LT α 3 Produced by Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis. *Science (1979).* 2013;342(6163):1243-1246. doi:10.1126/science.1243364
245. Tsuji M, Suzuki K, Kinoshita K, Fagarasan S. Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Semin Immunol.* 2008;20(1):59-66. doi:10.1016/j.smim.2007.12.003
246. Cazac BB, Roes J. TGF- β Receptor Controls B Cell Responsiveness and Induction of IgA In Vivo. *Immunity.* 2000;13(4):443-451. doi:10.1016/S1074-7613(00)00044-3
247. Dullaers M, Li D, Xue Y, et al. A T Cell-Dependent Mechanism for the Induction of Human Mucosal Homing Immunoglobulin A-Secreting Plasmablasts. *Immunity.* 2009;30(1):120-129. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.008
248. Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D, Cyster JG. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science (1979).* 2016;352(6287). doi:10.1126/science.aaf4822
249. Chu VT, Beller A, Rausch S, et al. Eosinophils Promote Generation and Maintenance of Immunoglobulin-A-Expressing Plasma Cells and Contribute to Gut Immune Homeostasis. *Immunity.* 2014;40(4):582-593. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.014
250. Girard-Madoux MJH, Gomez de Agüero M, Ganal-Vonarburg SC, et al. The immunological functions of the Appendix: An example of redundancy? *Semin Immunol.* 2018;36:31-44. doi:10.1016/j.smim.2018.02.005
251. Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR. Selective Adherence of IgA to Murine Peyer's Patch M Cells: Evidence for a Novel IgA Receptor. *The Journal of Immunology.* 2002;169(4):1844-1851. doi:10.4049/jimmunol.169.4.1844

252. Fransen F, Zagato E, Mazzini E, et al. BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity*. 2015;43(3):527-540. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.011
253. Sun W, Gudi RR, Johnson BM, Vasu C. Abundance and nuclear antigen reactivity of intestinal and fecal Immunoglobulin A in lupus-prone mice at younger ages correlate with the onset of eventual systemic autoimmunity. *Sci Rep*. 2020;10(1):14258. doi:10.1038/s41598-020-71272-8
254. Fitzpatrick Z, Frazer G, Ferro A, et al. Gut-educated IgA plasma cells defend the meningeal venous sinuses. *Nature*. 2020;587(7834):472-476. doi:10.1038/s41586-020-2886-4
255. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol*. 2010;189(1):111-126. doi:10.1083/jcb.200902153
256. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(9):564-580. doi:10.1038/nrm.2016.80
257. Howe KL, Reardon C, Wang A, Nazli A, McKay DM. Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability. *Am J Pathol*. 2005;167(6):1587-1597. doi:10.1016/s0002-9440(10)61243-6
258. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(6):1337-1345. doi:10.1681/ASN.V1061337
259. Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte-Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair. *Gastroenterology*. 2016;151(4):616-632. doi:10.1053/j.gastro.2016.07.008
260. Liu X, Yang G, Geng XR, et al. Microbial products induce claudin-2 to compromise gut epithelial barrier function. *PLoS One*. 2013;8(8):e68547. doi:10.1371/journal.pone.0068547
261. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834. doi:10.1080/17474124.2017.1343143
262. Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, et al. Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity*. 2015;43(4):727-738. doi:10.1016/j.immuni.2015.09.003
263. Plöger S, Stumpff F, Penner GB, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258(1):52-59. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06553.x

264. Gasaly N, de Vos P, Hermoso MA. Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A Focus on Bacterial Metabolism and Its Relevance for Intestinal Inflammation. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.658354
265. Liu B, Yang Y, Dai J, et al. TLR4 Up-Regulation at Protein or Gene Level Is Pathogenic for Lupus-Like Autoimmune Disease. *The Journal of Immunology.* 2006;177(10):6880-6888. doi:10.4049/jimmunol.177.10.6880
266. Lee TP, Huang JC, Liu CJ, et al. Featured Article: Interactions of surface-expressed TLR-4 and endosomal TLR-9 accelerate lupus progression in anti-dsDNA antibody transgenic mice. *Exp Biol Med.* 2014;239(6):715-723. doi:10.1177/1535370214525299
267. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity.* 2015;42(4):607-612. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005
268. Abdelaziz MM, Fathi N, Hetta HF, et al. Regulatory B Cells Evaluation in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Subclinical Atherosclerosis and Secondary Antiphospholipid Syndrome. *Mediterr J Rheumatol.* 2023;34(4):486. doi:10.31138/mjr.03823.rbc
269. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507(7492):366-370. doi:10.1038/nature12979
270. Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int Immunol.* 2015;27(10):531-536. doi:10.1093/intimm/dxv033
271. Oleinika K, Mauri C, Salama AD. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(1):11-26. doi:10.1038/s41581-018-0074-7
272. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity.* 2010;32(1):129-140. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009
273. Heinemann K, Wilde B, Hoerning A, et al. Decreased IL-10 + regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand J Rheumatol.* 2016;45(4):312-316. doi:10.3109/03009742.2015.1126346
274. Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, et al. Regulatory B Cells (B10 Cells) Have a Suppressive Role in Murine Lupus: CD19 and B10 Cell Deficiency Exacerbates Systemic Autoimmunity. *The Journal of Immunology.* 2010;184(9):4801-4809. doi:10.4049/jimmunol.0902385
275. Haas KM, Watanabe R, Matsushita T, et al. Protective and Pathogenic Roles for B Cells during Systemic Autoimmunity in NZB/W F1 Mice. *The Journal of Immunology.* 2010;184(9):4789-4800. doi:10.4049/jimmunol.0902391
276. Lal G, Kulkarni N, Nakayama Y, et al. IL-10 from marginal zone precursor B cells controls the differentiation of Th17, Tfh and Tfr cells in transplantation tolerance. *Immunol Lett.* 2016;170:52-63. doi:10.1016/j.imlet.2016.01.002

277. Cai X, Zhang L, Wei W. Regulatory B cells in inflammatory diseases and tumor. *Int Immunopharmacol*. 2019;67:281-286. doi:10.1016/j.intimp.2018.12.007
278. Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Su TT, Rawlings DJ, Braun J. B Cell Developmental Requirement for the $G\alpha i2$ Gene. *The Journal of Immunology*. 2003;170(4):1707-1715. doi:10.4049/jimmunol.170.4.1707
279. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B Cell Regulation of CD4+CD25+ T Regulatory Cells and IL-10 Via B7 is Essential for Recovery From Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. 2007;178(6):3447-3456. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3447
280. Zhang X, Deriaud E, Jiao X, Braun D, Leclerc C, Lo-Man R. Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*. 2007;204(5):1107-1118. doi:10.1084/jem.20062013
281. Mauri C, Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol*. 2008;29(1):34-40. doi:10.1016/j.it.2007.10.004
282. van der Vlugt LEPM, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhani A, et al. Schistosomes Induce Regulatory Features in Human and Mouse CD1dhi B Cells: Inhibition of Allergic Inflammation by IL-10 and Regulatory T Cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e30883. doi:10.1371/journal.pone.0030883
283. Lee JH, Noh J, Noh G, Choi WS, Lee SS. IL-10 is Predominantly Produced by CD19(low)CD5(+) Regulatory B Cell Subpopulation: Characterisation of CD19 (high) and CD19(low) Subpopulations of CD5(+) B cells. *Yonsei Med J*. 2011;52(5):851. doi:10.3349/ymj.2011.52.5.851
284. Sun F, Ladha SS, Yang L, et al. Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to rituximab in myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2014;49(4):487-494. doi:10.1002/mus.23951
285. Kessel A, Haj T, Peri R, et al. Human CD19+CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev*. 2012;11(9):670-677. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.018
286. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*. 2015;27(10):479-486. doi:10.1093/intimm/dxv038
287. Dubois F, Limou S, Chesneau M, Degauque N, Brouard S, Danger R. Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells. *Eur J Immunol*. 2020;50(11):1757-1769. doi:10.1002/eji.201948489
288. Geginat J, Vasco M, Gerosa M, et al. IL-10 producing regulatory and helper T-cells in systemic lupus erythematosus. *Semin Immunol*. 2019;44:101330. doi:10.1016/j.smim.2019.101330
289. Caielli S, Veiga DT, Balasubramanian P, et al. A CD4+ T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat Med*. 2019;25(1):75-81. doi:10.1038/s41591-018-0254-9

290. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. 2019;50(4):871-891. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.020
291. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19 + CD24 hi CD38 hi B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting T H 1 and T H 17 Differentiation. *Sci Transl Med*. 2013;5(173). doi:10.1126/scitranslmed.3005407
292. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2016;44(3):683-697. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.012
293. Amend A, Wickli N, Schäfer AL, et al. Dual Role of Interleukin-10 in Murine NZB/W F1 Lupus. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1347. doi:10.3390/ijms22031347
294. Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med*. 1994;179(1):305-310. doi:10.1084/jem.179.1.305
295. Biswas S, Bieber K, Manz RA. IL-10 revisited in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.970906
296. Tedder TF. B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset. *The Journal of Immunology*. 2015;194(4):1395-1401. doi:10.4049/jimmunol.1401329
297. Hasan MM, Thompson-Snipes L, Klintmalm G, et al. CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics. *The Journal of Immunology*. 2019;203(8):2110-2120. doi:10.4049/jimmunol.1900488
298. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6):633-641. doi:10.1038/nm.3554
299. Ekwuagu CE, Yu CR, Sun L, Wang R. Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):587-593. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.013
300. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol*. 2007;9(9):1000-1004. doi:10.1038/ncb434
301. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):447-453. doi:10.1016/j.coph.2009.04.008
302. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(4):984-1010. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.033

303. Chesneau M, Michel L, Dugast E, et al. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;26(10):2588-2598. doi:10.1681/ASN.2014040404
304. Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, et al. CD4+ T Cell–Derived IL-21 and Deprivation of CD40 Signaling Favor the In Vivo Development of Granzyme B–Expressing Regulatory B Cells in HIV Patients. *The Journal of Immunology*. 2015;194(8):3768-3777. doi:10.4049/jimmunol.1402568
305. Jahrsdörfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, et al. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood*. 2006;108(8):2712-2719. doi:10.1182/blood-2006-03-014001
306. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota–driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat Med*. 2014;20(11):1334-1339. doi:10.1038/nm.3680
307. Mishima Y, Oka A, Liu B, et al. Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10–producing regulatory B cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2019;129(9):3702-3716. doi:10.1172/JCI93820
308. Wu C, Sartor RB, Huang K, Tonkonogy SL. Transient activation of mucosal effector immune responses by resident intestinal bacteria in normal hosts is regulated by interleukin-10 signalling. *Immunology*. 2016;148(3):304-314. doi:10.1111/imm.12612
309. Daien CI, Tan J, Audo R, et al. Gut-derived acetate promotes B10 cells with antiinflammatory effects. *JCI Insight*. 2021;6(7). doi:10.1172/jci.insight.144156
310. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016
311. Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. 2019;176(3):610-624.e18. doi:10.1016/j.cell.2018.11.035
312. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, et al. Control of Toll-like Receptor 7 Expression Is Essential to Restrict Autoimmunity and Dendritic Cell Proliferation. *Immunity*. 2007;27(5):801-810. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.009
313. Chen YL, Lee CC, Lin YL, Yin KM, Ho CL, Liu T. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*. 2015;16(S18):S13. doi:10.1186/1471-2105-16-S18-S13
314. Schumann P. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Editors), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Modern Microbiological Methods)*. XXIX + 329 S., 46 Abb., 28 Tab. Chichester — New York — Brisbane — Toronto — Singapore 1991. John Wiley & Sons. \$ 55.00. ISBN: 0–471–92906–9. *J Basic Microbiol*. 1991;31(6):479-480. doi:10.1002/jobm.3620310616

315. Paun A, Yau C, Meshkibaf S, et al. Association of HLA-dependent islet autoimmunity with systemic antibody responses to intestinal commensal bacteria in children. *Sci Immunol*. 2019;4(32). doi:10.1126/sciimmunol.aau8125
316. Finak G. flowWorkspaceData: A data package containing two flowJo, one diva xml workspace and the associated fcs files as well as three GatingSets for testing the flowWorkspace, openCyto and CytoML packages.R package version 3.16.0. Published online 2024.
317. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9
318. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
319. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018;6(1):90. doi:10.1186/s40168-018-0470-z
320. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*. 2018;6(1):226. doi:10.1186/s40168-018-0605-2
321. McDonald D, Price MN, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2012;6(3):610-618. doi:10.1038/ismej.2011.139
322. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
323. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312-1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
324. Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011;12(6):R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
325. Qiu A, Miller A, Zotti FD, et al. FcγRIV is required for IgG2c mediated enhancement of RBC alloimmunization. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.972723
326. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):63-72. doi:10.1038/nri982
327. Pabst O, Slack E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunol*. 2020;13(1):12-21. doi:10.1038/s41385-019-0227-4
328. Walters KE, Martiny JBH. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS One*. 2020;15(9):e0233872. doi:10.1371/journal.pone.0233872

329. Vujkovic-Cvijin I, Welles HC, Ha CWY, et al. The systemic anti-microbiota IgG repertoire can identify gut bacteria that translocate across gut barrier surfaces. *Sci Transl Med.* 2022;14(658). doi:10.1126/scitranslmed.abl3927
330. Soni C, Wong EB, Domeier PP, et al. B Cell–Intrinsic TLR7 Signaling Is Essential for the Development of Spontaneous Germinal Centers. *The Journal of Immunology.* 2014;193(9):4400-4414. doi:10.4049/jimmunol.1401720
331. Ma L, Morel L. Loss of Gut Barrier Integrity In Lupus. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.919792
332. Yang Y, Palm NW. Immunoglobulin A and the microbiome. *Curr Opin Microbiol.* 2020;56:89-96. doi:10.1016/j.mib.2020.08.003
333. Li DP, Han YX, He YS, et al. A global assessment of incidence trends of autoimmune diseases from 1990 to 2019 and predicted changes to 2040. *Autoimmun Rev.* 2023;22(10):103407. doi:10.1016/j.autrev.2023.103407
334. Christovich A, Luo XM. Gut Microbiota, Leaky Gut, and Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.946248
335. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-9. doi:10.1038/s12276-018-0126-x
336. Muto S, Hata M, Taniguchi J, et al. Claudin-2–deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(17):8011-8016. doi:10.1073/pnas.0912901107
337. Wang Y, Mumm JB, Herbst R, Kolbeck R, Wang Y. IL-22 Increases Permeability of Intestinal Epithelial Tight Junctions by Enhancing Claudin-2 Expression. *The Journal of Immunology.* 2017;199(9):3316-3325. doi:10.4049/jimmunol.1700152
338. Matei DE, Menon M, Alber DG, et al. Intestinal barrier dysfunction plays an integral role in arthritis pathology and can be targeted to ameliorate disease. *Med.* 2021;2(7):864-883.e9. doi:10.1016/j.medj.2021.04.013
339. Domeier PP, Schell SL, Rahman ZSM. Spontaneous germinal centers and autoimmunity. *Autoimmunity.* 2017;50(1):4-18. doi:10.1080/08916934.2017.1280671
340. Bemark M, Pitcher MJ, Dionisi C, Spencer J. Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity. *Trends Immunol.* 2024;45(3):211-223. doi:10.1016/j.it.2024.01.006
341. Carsetti R, Di Sabatino A, Rosado MM, et al. Lack of Gut Secretory Immunoglobulin A in Memory B-Cell Dysfunction-Associated Disorders: A Possible Gut-Spleen Axis. *Front Immunol.* 2020;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02937

342. Bonami RH, Thurman CE, Verma S, et al. Bruton's Tyrosine Kinase Supports Gut Mucosal Immunity and Commensal Microbiome Recognition in Autoimmune Arthritis. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.748284
343. Wang H, Wang Q, Yang C, et al. *Bacteroides acidifaciens* in the gut plays a protective role against CD95-mediated liver injury. *Gut Microbes.* 2022;14(1). doi:10.1080/19490976.2022.2027853
344. Jacobson A, Lam L, Rajendram M, et al. A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host Microbe.* 2018;24(2):296-307.e7. doi:10.1016/j.chom.2018.07.002
345. Ray N, Jeong H, Kwon D, Kim J, Moon Y. Antibiotic Exposure Aggravates Bacteroides-Linked Uremic Toxicity in the Gut-Kidney Axis. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.737536
346. Zhang K, Xu Y, Yang Y, et al. Gut microbiota-derived metabolites contribute negatively to hindgut barrier function development at the early weaning goat model. *Animal Nutrition.* 2022;10:111-123. doi:10.1016/j.aninu.2022.04.004
347. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, et al. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA+ B cells. *Immunobiology.* 2013;218(4):645-651. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.033
348. Kappler K, Hennes T. Emergence and significance of carbohydrate-specific antibodies. *Genes Immun.* 2020;21(4):224-239. doi:10.1038/s41435-020-0105-9
349. Ayyappan P, Harms RZ, Buckner JH, Sarvetnick NE. Coordinated Induction of Antimicrobial Response Factors in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00658
350. Chen ST, Oliveira TY, Gazumyan A, Cipolla M, Nussenzweig MC. B cell receptor signaling in germinal centers prolongs survival and primes B cells for selection. *Immunity.* 2023;56(3):547-561.e7. doi:10.1016/j.immuni.2023.02.003
351. Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol.* 2021;14(4):793-802. doi:10.1038/s41385-021-00389-4
352. Dolton G, Bulek A, Wall A, et al. HLA A*24:02-restricted T cell receptors cross-recognize bacterial and preproinsulin peptides in type 1 diabetes. *Journal of Clinical Investigation.* 2024;134(18). doi:10.1172/JCI164535
353. Munroe ME, Anderson JR, Gross TF, Stunz LL, Bishop GA, James JA. Epstein-Barr Functional Mimicry: Pathogenicity of Oncogenic Latent Membrane Protein-1 in Systemic Lupus Erythematosus and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.606936

354. Katsuyama T, Tsokos GC, Moulton VR. Aberrant T Cell Signaling and Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01088
355. Tyler CJ, Guzman M, Lundborg LR, et al. Antibody secreting cells are critically dependent on integrin $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 for intestinal recruitment and control of the microbiota during chronic colitis. *Mucosal Immunol.* 2022;15(1):109-119. doi:10.1038/s41385-021-00445-z
356. Zhang H, Zheng Y, Pan Y, et al. A mutation that blocks integrin $\alpha 4\beta 7$ activation prevents adaptive immune-mediated colitis without increasing susceptibility to innate colitis. *BMC Biol.* 2020;18(1):64. doi:10.1186/s12915-020-00784-6
357. Velázquez P, Wei B, McPherson M, et al. Villous B Cells of the Small Intestine Are Specialized for Invariant NK T Cell Dependence. *The Journal of Immunology.* 2008;180(7):4629-4638. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4629
358. Lycke NY, Bemark M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal Immunol.* 2017;10(6):1361-1374. doi:10.1038/mi.2017.62
359. Komban RJ, Strömberg A, Biram A, et al. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nat Commun.* 2019;10(1):2423. doi:10.1038/s41467-019-10144-w
360. Singh TP, Zhang HH, Hwang ST, Farber JM. IL-23- and Imiquimod-Induced Models of Experimental Psoriasis in Mice. *Curr Protoc Immunol.* 2019;125(1). doi:10.1002/cpim.71
361. Grine L, Steeland S, Van Ryckeghem S, et al. Topical imiquimod yields systemic effects due to unintended oral uptake. *Sci Rep.* 2016;6(1):20134. doi:10.1038/srep20134
362. Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, et al. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood.* 2009;113(2):377-388. doi:10.1182/blood-2008-04-151712
363. Damm J, Wiegand F, Harden LM, Gerstberger R, Rummel C, Roth J. Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the toll-like receptor 7 agonist imiquimod. *Neuroscience.* 2012;201:166-183. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.11.013
364. Cahana I, Iraqi FA. Impact of host genetics on gut microbiome: Take-home lessons from human and mouse studies. *Animal Model Exp Med.* 2020;3(3):229-236. doi:10.1002/ame2.12134
365. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017;114(40):10713-10718. doi:10.1073/pnas.1711235114
366. Sun H, Guo Y, Wang H, et al. Gut commensal *Parabacteroides distasonis* alleviates inflammatory arthritis. *Gut.* 2023;72(9):1664-1677. doi:10.1136/gutjnl-2022-327756

367. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-498. doi:10.1016/j.cell.2009.09.033
368. Hong H, Alduraibi F, Ponder D, et al. Host Genetics But Not Commensal Microbiota Determines the Initial Development of Systemic Autoimmune Disease in <scp>BXD2</scp> Mice. *Arthritis & Rheumatology*. 2022;74(4):634-640. doi:10.1002/art.42008
369. Mu Q, Zhang H, Liao X, et al. Control of lupus nephritis by changes of gut microbiota. *Microbiome*. 2017;5(1):73. doi:10.1186/s40168-017-0300-8
370. Gupta S, Gupta SL, Singh A, et al. IgA Determines Bacterial Composition in the Gut. *Crohns Colitis* 360. 2023;5(3). doi:10.1093/crocol/otad030
371. Zimmermann J, Hübschmann T, Schattenberg F, et al. High-resolution microbiota flow cytometry reveals dynamic colitis-associated changes in fecal bacterial composition. *Eur J Immunol*. 2016;46(5):1300-1303. doi:10.1002/eji.201646297
372. Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, et al. Immunoglobulin A Coating Identifies Colitogenic Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*. 2014;158(5):1000-1010. doi:10.1016/j.cell.2014.08.006
373. Johnson BM, Gaudreau MC, Gudi R, Brown R, Gilkeson G, Vasu C. Gut microbiota differently contributes to intestinal immune phenotype and systemic autoimmune progression in female and male lupus-prone mice. *J Autoimmun*. 2020;108:102420. doi:10.1016/j.jaut.2020.102420
374. Gaudreau MC, Johnson BM, Gudi R, Al-Gadban MM, Vasu C. Gender bias in lupus: does immune response initiated in the gut mucosa have a role? *Clin Exp Immunol*. 2015;180(3):393-407. doi:10.1111/cei.12587
375. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(5):985-992. doi:10.1016/j.jaci.2010.01.058
376. Lloyd DH, Viac J, Werling D, Rème CA, Gatto H. Role of sugars in surface microbe–host interactions and immune reaction modulation. *Vet Dermatol*. 2007;18(4):197-204. doi:10.1111/j.1365-3164.2007.00594.x
377. Tremain AC, Wallace RP, Lorentz KM, et al. Synthetically glycosylated antigens for the antigen-specific suppression of established immune responses. *Nat Biomed Eng*. 2023;7(9):1142-1155. doi:10.1038/s41551-023-01086-2
378. Wilson DS, Damo M, Hirosue S, et al. Synthetically glycosylated antigens induce antigen-specific tolerance and prevent the onset of diabetes. *Nat Biomed Eng*. 2019;3(10):817-829. doi:10.1038/s41551-019-0424-1
379. Matsumura Y, Watanabe R, Fujimoto M. Suppressive mechanisms of regulatory B cells in mice and humans. *Int Immunol*. 2023;35(2):55-65. doi:10.1093/intimm/dxac048

-
380. Le Berre L, Chesneau M, Danger R, et al. Connection of BANK1, Tolerance, Regulatory B cells, and Apoptosis: Perspectives of a Reductionist Investigation. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.589786
 381. Yang J, Ren J, Yang Y, et al. BANK1 alters B cell responses and influences the interactions between B cells and induced T regulatory cells in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):9. doi:10.1186/s13075-017-1503-x
 382. Petta I, Fraussen J, Somers V, Kleinewietfeld M. Interrelation of Diet, Gut Microbiome, and Autoantibody Production. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00439