

## Revisión bibliográfica

# Células B como blanco de terapias en síndrome de Sjögren

## B-cell targeted therapies in Sjogren's syndrome

Felipe Mendoza Pérez,<sup>1,2</sup> María Cristina Fresán Orozco,<sup>1</sup> Julia Pérez-Ramos,<sup>1</sup> Alfonso Salgado Aguayo,<sup>2</sup> Fabiola Esther Gómez Arroyo,<sup>3</sup> María del Carmen Navarro González<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México

---

### Resumen

El síndrome de Sjögren primario está caracterizado por la infiltración de células mononucleares de las glándulas exocrinas y una actividad aumentada de los linfocitos B. Durante mucho tiempo se pensó que las células T eran los efectores primarios, evidencia reciente indica que las células B juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Las terapias convencionales no modifican el curso de la enfermedad, por lo que las células B se han vuelto atractivas como blanco en terapias, el uso de anticuerpos monoclonales contra CD20 (Rituximab), induce una rápida disminución de las células B por lo que puede mejorar la enfermedad temprana o con involucramiento extraglandular. Existen en etapa experimental otras moléculas con posibilidades terapéuticas una de estas es el bloqueo del factor activador de células B.

---

### Abstract

Primary Sjogren's syndrome is characterized by infiltration of mononuclear cells of exocrine glands and an activity of lymphocytes B. For a long time thought that the T cells were the primary effector, recent evidence indicates that B cells play an important role in the development of the disease. Conventional therapies do not alter the course of the disease, by which B cells have become attractive as target in therapies, the use of monoclonal antibodies against CD20 (Rituximab), induces a rapid depletion of B cells by which may improve early disease or with extraglandular involvement. There are other molecules with therapeutic possibilities in experimental stage one of these is the blocking of B-cell activating factor.

---

**Palabras clave:** Síndrome de Sjögren, Células B, Terapia de células B, Rituximab, Anti-CD20.

---

**Key words:** Sjögren's syndrome, B Cells, B cells Therapy, Rituximab, Anti-CD20.

---

### Correspondencia:

M en C. Felipe Mendoza Pérez  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco  
Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud  
Delegación Coyoacán, 04960, México, D. F.  
Teléfono: (+52-55)5483-3049 y (+52-55)5483-7253  
Correo electrónico: fmendoza@correo.xoc.uam.mx

Fecha de recepción: 23 de enero de 2014

Fecha de recepción de modificaciones:

07 de noviembre de 2014

Fecha de aceptación: 06 de febrero de 2015

## Introducción

Desde la primera descripción de anticuerpos naturales autorreactivos se ha hecho un gran esfuerzo para tratar de determinar la generación de estos, su regulación, función o tratamiento. La mayor parte de los estudios se han enfocado en los anticuerpos naturales IgM. En modelos experimentales con animales se ha determinado la presencia de anticuerpos naturales IgM, sin que exista un antígeno potencial, además de que su reactividad es consistentemente conservada entre individuos.<sup>1-3</sup> Se ha demostrado que los anticuerpos naturales IgM están presentes en cada suero humano.<sup>4</sup> El hecho de que esos anticuerpos naturales sean auto-reactivos sugiere que pueden funcionar manteniendo la homeostasis del tejido.<sup>5</sup> Los autoanticuerpos IgM se pueden unir a neo-antígenos apoptóticos tales como fosfatidilserina, cardiolipina y otros. Dados estos patrones de reconocimiento, se puede hipotetizar que los anticuerpos naturales IgM sirven como una manera conservada de eliminación de cuerpos apoptóticos.<sup>6-8</sup> Los anticuerpos naturales IgM son producidos por las células B1, mientras que los anticuerpos IgG se producen por la interacción de células B-2 foliculares con células T.<sup>9</sup> Los anticuerpos IgM se seleccionan positivamente cuando se encuentran con el auto-antígeno, mientras que la producción de IgG está estrictamente controlada por la auto-tolerancia. Por lo anterior la presencia de autoanticuerpos IgG se considera un rompimiento de la auto-tolerancia.<sup>10</sup> Este concepto es soportado por el hecho de que en muchas enfermedades autoinmunes que incluyen: artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico, son iniciadas o exacerbadas por anticuerpos anti-IgG específicos para componentes celulares o tisulares.<sup>11-13</sup> El apareamiento de las cadenas pesadas y ligeras después de su reordenamiento genera un repertorio de linfocitos B de entre  $10^7$  y  $10^8$ , esta diversidad del repertorio de linfocitos B debe tener una contribución importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes a través de la secreción de anticuerpos patogénicos autorreactivos los cuales pueden causar daño en los tejidos.<sup>14</sup>

### Linfocitos B de ratón

Las células B en ratón se dividen en tres conjuntos principales: células B1, estas células se encuentran en la cavidad peritoneal las cuales se subdividen a su vez en B1a y B1b. Las células B1a se desarrollan durante el periodo prenatal en el hígado del feto, persisten después del nacimiento y contribuyen en gran parte a la presencia de anticuerpos naturales IgM, aunque también pueden producir los isotipos IgG e IgA en suero y se activan con antígenos T-independientes. Las células B1a también se pueden encontrar en tejidos linfoides asociados a mucosas, donde pueden secretar IgA. Las células B1a se identifican por la expresión de la glucoproteína de superficie CD5.

Las células B1b se desarrollan principalmente de precursores de médula ósea. Algunas pueden expresar ADN mutado, estas células también responden a antígenos timo-independientes y son importantes para la producción de anticuerpos contra parásitos y bacterias patógenas. Estas células son CD5<sup>-</sup>.<sup>15</sup>

### Fenotipo de las células B en ratón

Las células B1 son un subconjunto de las células B que secretan principalmente anticuerpos naturales sin una estimulación aparente por antígeno. Estos anticuerpos naturales son poli reactivos y reconocen antígenos naturales y extraños. Estos anticuerpos son cruciales para la protección del hospedero contra múltiples infecciones. Estas células se subdividen en células B1a y B1b.<sup>16</sup>

Hasta ahora las células B1a y B1b son usualmente identificadas por medio de una combinación de marcadores de superficie con el siguiente fenotipo CD19<sup>hi</sup>CD23<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>CD5<sup>±</sup>. Las células B1 son ligeramente más grandes en tamaño que las células B2 en reposo. Las células B1a son CD5<sup>+</sup> y las células B1b son CD5<sup>-</sup>.<sup>17</sup>

Las células B2 de zona marginal tienen el fenotipo: CD19<sup>mid</sup>CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>-</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>CD5<sup>-</sup>. Mientras que las células B2 foliculares tienen el siguiente fenotipo: CD19<sup>mid</sup>CD23<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>low</sup>IgD<sup>hi</sup>CD5<sup>-</sup>. Estas células constituyen la mayor parte de las células B de bazo y están localizadas en la zona marginal y los folículos.<sup>10</sup>

En un estudio de la respuesta de las células B1 a *Streptococcus pneumoniae* realizado por Tedder encontró que las células B1a producen anticuerpos naturales activos de tipo innato en una respuesta temprana a la bacteria, mientras que las células B1b actúan posteriormente como un componente del sistema inmune adaptativo.<sup>18</sup> Dicho de otra manera las células B1a secretan anticuerpos naturales que protegen contra la infección o disminuyen el estallido (número de bacterias) bacteriano cuando la infección es establecida, mientras que las células B1b secretan el anticuerpo necesario para eliminar a la bacteria.<sup>19</sup>

### Células B en Humano

Células B humanas IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> se encuentran enriquecidas en la región del bazo la cual es análoga a la zona marginal de ratón, pero no se sabe si son el equivalente a células de ratón de zona marginal, reconocen antígenos a través de receptores semi-invariantes los cuales estimulan su rápida diferenciación en células secretoras de anticuerpo y participan en respuestas inmunes independientes de células T a organismos patógenos en sangre, capsulados y sus antígenos no proteínicos.<sup>20</sup>

Las células B2 (células B foliculares) se generan en la médula ósea durante toda la vida y pueden responder a antígenos timo-dependientes en los centros germinales cuando son

estimulados por antígenos proteínicos y son requeridas por la inmunidad adaptativa.<sup>21-23</sup>

Las células B maduras humanas periféricas se pueden subdividir dependiendo de la expresión de IgD y CD38. Las células vírgenes son IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> y tienen secuencias de región IgV no mutadas, IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> son células de memoria, mientras que las células B de fenotipo IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> e IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> se definen como células de memoria de centro germinal (GC) y pre-GC, en amígdalas se identificó una célula B cuyo fenotipo es IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>FSC<sup>hi</sup>CD71<sup>+</sup> y la cual debe representar una población intermedia entre células B vírgenes y células B GC. CD27 es un marcador asociado a células B de memoria: IgM<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>.<sup>20</sup>

En humanos se ha encontrado en diferentes tejidos una subpoblación de células B que expresa CD5<sup>+</sup> y es capaz de producir autoanticuerpos. En un inicio se pensó que esta molécula podría ser el equivalente al de las células B1 de ratón pero aparentemente no es un marcador de poblaciones en estas células que se mantenga a través de diferentes especies, y a diferencia de ratón este marcador no permite una clara separación de subpoblaciones en humanos,<sup>24, 25</sup> estas células producen anticuerpos autorreactivos poliespecíficos como por ejemplo factor reumatoide y anti-ssDNA. Las células B CD5<sup>+</sup> en humanos no han sido caracterizadas y tampoco está claro si estas células son el equivalente de las células B1a de ratón,<sup>26, 27</sup> la introducción del sistema Bm (B madura), permitió una mejor separación de poblaciones de células B, mediante el uso de anti-CD38 y anti-IgD.<sup>28</sup>

### **Clasificación de las células B mediante el sistema Bm**

Dentro de los primeros esquemas de clasificación de las células B humanas, destaca el de Liu y Banchereau en el cual estimulan a las células para diferenciarlas desde células vírgenes hasta células centrogerminal. El uso como marcadores de anti-IgD y anti-CD38 divide de manera gruesa linfocitos de tonsila en cuatro subpoblaciones en base a CD23. CD23 separa células B vírgenes, las cuales se originan en la médula ósea (IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) en las subpoblaciones Bm1: CD23<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> y Bm2 CD23<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>.

La expresión diferencial de IgM identifica a las subpoblaciones celulares B Pre-GC; Bm2'a: IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y Bm2'b: IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>. CD77 separa células Bm3 (centroblastos): CD77<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y Bm4 Cd77<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (centrocitos). Y por último las células B de memoria doble negativas IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> son CD27<sup>+</sup>.

Esta división sirvió para clasificar células B de sangre periférica, amígdalas y otros órganos linfoides secundarios, y permitió la

cuantificación y correlación de subpoblaciones de células B en diferentes enfermedades (cáncer, autoinmunidad y otras).<sup>29</sup>

Sin embargo como en muchos casos esta clasificación solo sirvió en un inicio ya que con los años y el progreso de la citometría de flujo, así como la caracterización fenotípica con nuevos anticuerpos monoclonales se ha observado que las células CD27<sup>+</sup> pueden ser subdivididas en diferentes poblaciones de células B de memoria en base a algunas características como la expresión de inmunoglobulinas, el isotipo secretado por células B en cultivo y otras características. Por otra parte se ha observado que el marcador CD27 no identifica todas las células B de memoria periférica por lo que como es bien sabido un solo marcador no es suficiente para identificar a una población única.<sup>30-32</sup>

En sangre periférica al igual que en amígdalas se han detectado siete subpoblaciones las mismas que se han determinado en tonsilas basándose solamente en la expresión de superficie de CD38 e IgD: Las células B maduras vírgenes (Bm) se dividen en Bm1 (CD38<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>) y Bm2 (CD38<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), estas células son activadas por antígeno específico en áreas extrafoliculares a través de la interacción con células dendríticas y células T antígeno-específicas. A su vez estas células activadas se vuelven células de centro germinal (GC) Bm2' (CD38<sup>++</sup>IgD<sup>+</sup>). En los GC, las células Bm2' se diferencian en centroblastos Bm3 (CD38<sup>+++</sup>IgD<sup>+</sup>), en estas células se puede llevar a cabo una hipermutación somática en la región del gen V durante el proceso de proliferación. A su vez estas últimas células se seleccionarán durante su diferenciación en centrocitos Bm4 (CD38<sup>++</sup>IgD<sup>-</sup>), dependiendo de la afinidad del receptor de células B (BCR). Estas células B activadas posteriormente se diferenciarán en células de memoria temprana (CD38<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>), células de memoria Bm5 (CD38<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) o en células plasmáticas de alta afinidad.<sup>33-35</sup>

### **Células B Regulatorias**

En modelos autoinmunes en ratón se ha descrito una subpoblación de células B regulatorias (Breg). En humanos no se han caracterizado fenotípicamente, aunque algunos estudios sugieren que estas células pueden controlar la proliferación y diferenciación de células T y células dendríticas. En enfermedades autoinmunes, las células Breg probablemente jueguen un papel importante en la desregulación del sistema inmune lo cual puede conducir a una pérdida de la tolerancia.<sup>36</sup>

### **Métodos actuales de clasificación de linfocitos B**

Actualmente el análisis de los datos de las poblaciones de células, se hace mediante el uso de ventanas manuales alrededor de las poblaciones en estudio, sin embargo esta manera de análisis no va de acuerdo con el desarrollo de reactivos e instrumentación de equipos más sofisticados de citometría.

Esto tiene algunos contras como son: 1) las regiones dibujadas por los usuarios alrededor de los límites de las poblaciones son totalmente subjetivas lo que podría dejar fuera constituyentes con similitudes no apreciadas a simple vista, 2) la variación inherente al usuario en el análisis en cuestión y 3) los pasos repetidos en un análisis pueden disminuir el número de eventos aprovechables. Actualmente están en desarrollo métodos de análisis automatizados. Uno de ellos está basado en la densidad de la población, mediante un modelo de algoritmo llamado FLOCK (Flow Clustering without k, por sus siglas en inglés), este algoritmo identifica grupos de eventos (poblaciones) en archivos de datos de citometría, basado básicamente en dos parámetros: fluorescencia múltiple y parámetros de tamaño y complejidad de las poblaciones celulares.

En este método de análisis el espacio dimensional formado por los parámetros de fluorescencia forma hiper-regiones de los eventos (células analizadas). Estas hiper-regiones de eventos densos son unidas con regiones vecinas para formar los grupos iniciales de eventos, seguido por el cálculo de un centro en cada grupo de eventos. Mediante el uso de FLOCK el grupo de Kaminski et. al. Identificó 17 grupos de eventos de líneas de células B en células mononucleares de sujetos sanos teñidas con un panel de reactivos de 10 fluorocromos.<sup>37</sup>

### Células B Transicionales

Otras células que se han descrito en humanos son las células B transicionales. Mediante el uso de una combinación de marcadores de memoria que incluye IgD (célula más virgen) y CD27 (célula más diferenciada) se consiguió separar 3 poblaciones. Estas se consideran estadios tempranos de células B en desarrollo, que son liberadas de médula ósea y migran a órganos linfoides secundarios. Estas células son las:

T1: IgD<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>CD10<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>MTG<sup>+</sup>;  
 T2: IgD<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>CD10<sup>+</sup>CD24<sup>high/+</sup>CD38<sup>high/+</sup>MTG<sup>+</sup>  
 T3: IgD<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>CD10<sup>neg</sup>CD24<sup>+/low</sup>CD38<sup>+/low</sup>MTG<sup>+</sup>

Se encuentran dentro de las células IgD<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup> y mediante el uso de CD24 y CD38 se separan las poblaciones T1/T2 transicionales de las células B vírgenes maduras T3, esta última población no puede ser distinguida de las células B maduras-vírgenes solo con el uso de los anticuerpos B de memoria (CD27<sup>-</sup>), por lo que se tiene que utilizar un colorante reportero; MTG. Mediante el uso de inmunohistoquímica o separación de las células mediante un citómetro se han identificado estas dos subpoblaciones en las glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren primario (pSS), lo que sugiere una producción local de auto-anticuerpos.<sup>38</sup>

En ratón, las células B transicionales sirven de puente entre las células B inmaduras en la médula ósea y las células B vírgenes

maduras y se subdividen en varias subpoblaciones. Inicialmente estas células se subdividieron en 2 basados en la expresión de CD21 e IgD (T1 y T2), sin embargo otros las han subdividido en 3 subpoblaciones, basados en la expresión de CD23 y la expresión de IgM (T1, T2 y T3). Lo que es claro es que tanto en ratón como en humanos la transición de células B inmaduras a células B vírgenes maduras es un proceso que implica varios estadios de desarrollo. Es probable que en humanos exista un proceso de varios estadios similar al ratón, pero a diferencia del ratón en humanos el desarrollo celular no ha sido completamente caracterizado.<sup>39</sup>

Una de las dificultades en la identificación subpoblaciones de células B periféricas es que hay múltiples cambios de fenotipo durante el desarrollo, y el conocimiento actual del modelo de expresión de esos marcadores es limitado.

### Células B1 Humanas

Durante mucho tiempo ha existido la controversia con respecto a la existencia de células B1 en humanos, mientras que en ratón su existencia no es puesta en debate, las células B1 de ratón son el principal constituyente de la poza de linfocitos B en las cavidades pleurales y peritoneales y son caracterizadas como CD5<sup>+</sup> y/o CD11b<sup>+</sup>. En humanos se han detectado células B en nódulos linfáticos fetales, bazo, cavidad peritoneal, mesenterio y diferentes tejidos humanos que expresan CD5. Sin embargo CD5 no es un marcador restringido exclusivamente a las células B1 en humanos ya que este es expresado en células B inmaduras/transicionales en médula ósea, sangre, bazo y células T.<sup>40</sup>

Recientemente Griffin y col. describieron una población en humanos que es similar desde el punto de vista funcional a las células B1 de ratón. Griffin y col. estudiaron varias poblaciones con fenotipos definidos, obtenidas de sangre de cordón umbilical y sangre periférica humana y probaron en estas células propiedades funcionales características de las células B1 de ratón. Bajo esos criterios identificaron una subpoblación de células cuyo fenotipo era CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD70<sup>-</sup> la cual expresa CD11b.<sup>41</sup>

Sin embargo este hallazgo aun genera controversia en el sentido de la manera en que se eligen las estrategias de las ventanas, la formación de dímeros de células T-B y otros. La manera en la cual Griffin caracterizó estas células fue con propiedades funcionales similares a las células B1 de ratón, la secreción espontánea de IgM, señalización constitutiva del receptor de células B (BCR) y la habilidad de inducir la proliferación de células T alogénicas.<sup>40, 42, 43</sup>

Descartore y col, sugieren que desde el punto de vista cuantitativo a pesar de una considerable variación entre la sangre de donadores individuales, la proporción de células

CD43<sup>+</sup> entre células B CD27<sup>+</sup> representan un promedio de 40-50 % en adultos, la frecuencia es mayor en individuos jóvenes con respecto a individuos mayores, esta observación es muy similar a la frecuencia de células B de zona marginal, con la diferencia de que las de zona marginal son IgD<sup>int</sup> y las CD43<sup>+</sup> son principalmente IgD<sup>high</sup>. Sin embargo la primera objeción a la población descrita por Griffin es que las células CD43<sup>+</sup> son células más grandes por lo que se requiere una ventana más amplia para analizarlas con la posibilidad de incluir dobletes dentro de ésta. Los autores marcaron con anticuerpos anti-CD3 y una fracción apreciable de células CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>, se tiñeron de manera positiva para CD3<sup>+</sup>, por lo que es posible que la población CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> son dobletes que incluyen células T que participan para el marcaje de CD43 y CD27. La conclusión de los autores es que las variaciones observadas en la población CD43<sup>+</sup> pueden ser por la tinción de artefactos y que la potencial presencia de dobletes en la población CD20<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> analizada por Griffin y col. pone en duda las características funcionales descritas en la subpoblación B1 descrita por Ellos, por lo que habrá que hacer nuevos ensayos y descartar si la población descrita son células activadas en su proceso de diferenciación a células plasmáticas o realmente es el equivalente de la población de células B1 de ratón.<sup>42</sup>

Los marcadores CD27 y CD43 son coexpresados en la mayoría de las células T y plasmáticas. Pérez Andrés y col. desarrollaron una estrategia de análisis citométrico para discriminar entre células B CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> y células de memoria CD27<sup>+</sup> en sangre periférica humana. Al igual que Griffin y col identificaron una subpoblación CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> dentro de las poblaciones CD19<sup>+</sup> o CD20<sup>+</sup> en cordón umbilical y en sangre periférica de niños y adultos. La frecuencia iba del 1 al 25.5 % del total de células CD19<sup>+</sup> o CD20<sup>+</sup> en sangre. Solo una minoría de los eventos CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> parecen ser linfocitos B verdaderos (0.3-2-3 % de las células CD19<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD38<sup>dim</sup>) y consisten de células IgM<sup>+</sup> e IgM<sup>-</sup>. La frecuencia total fue más de 10 veces menor que las frecuencias de células B de memoria CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> y CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> en sangre de adultos. Por todo lo anterior los autores concluyeron que los linfocitos B CD43<sup>+</sup> constituyen solo una pequeña proporción del total de linfocitos B CD27<sup>+</sup>.

Finalmente sus resultados confirman una disminución con la edad de la población de células B circulantes CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>, por lo que hay que ser precavido en la definición de las células B1 humanas dentro de esta población tan heterogénea. El análisis hecho por los autores de la población CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>, revela que la mayoría de las células presentes pueden ser células plasmáticas CD38<sup>hi</sup> o células T CD3<sup>+</sup> contaminantes. Por lo que la determinación de esta proporción de células T contaminantes puede explicar la frecuencia tan alta de células CD5<sup>+</sup> reportada por Griffin y col. ya que todas las células T expresan CD5.<sup>43</sup>

Griffin y col. en su réplica, dice que los eventos CD3<sup>+</sup> dentro de la población CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> purificada por citometría son raros. En sus primeros ensayos probaron la función de células B1 purificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), la población purificada CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> contenía <3 % de eventos CD3<sup>+</sup>. En un experimento posterior a partir de PBMC se obtuvieron células CD19 enriquecidas por perlas magnéticas y las células B1 fueron purificadas a partir de estas últimas, esta población CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> contenía <1 % de eventos CD3<sup>+</sup>. Por último Griffin y col. reproduciendo el protocolo de Pérez-Andres y col.<sup>43</sup> y Descatoire y col.,<sup>40</sup> reconstituyeron las células mononucleares a una concentración relativamente alta y observaron eventos CD3<sup>+</sup> en la ventana CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>, por lo que sugiere diluir y homogenizar la muestra para reducir los eventos CD3<sup>+</sup> en la ventana de las células B1 putativas, ya que la presencia de células CD3 dentro de la población de células B CD20<sup>+</sup>, induce la formación de dobletes B:T. Por último Pérez-Andrés y col. encontraron que las células CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> expresaban niveles elevados de CD38 por lo que probablemente fueran células plasmáticas. Griffin usa CD20 para identificar células B1, ya que CD19 no excluye plasmablastos ni células plasmáticas.<sup>41</sup>

### Síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren primario (pSS) es una enfermedad sistémica autoinmune asociada con anomalías humorales y celulares caracterizada por una inflamación, infiltración linfoplasmocítica y una destrucción progresiva de las glándulas salivales y lagrimales y ojos y boca seca, la mitad de los pacientes desarrollan características extraglandulares, que incluyen artritis, enfermedad pulmonar intersticial difusa, involucramiento del sistema nervioso central y nefropatía tubular.<sup>44</sup> Se ha colocado a las células T como las efectoras primarias, sin embargo evidencia sugiere un papel clave de las células B en el desarrollo del síndrome. Entre las características importantes de la participación de las células B esta la producción de factor reumatoide, la alta producción de autoanticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La los cuales pueden ser detectados en sangre periférica en el 60-90 % de los pacientes con el síndrome.<sup>45, 46</sup>

Otros hallazgos importantes en pSS es el incremento importante de células B maduras vírgenes (Bm) y una disminución de las de memoria, por otra parte una relación de células Bm2+Bm2'/Bm5 tempranas+Bm5 tardías es diagnóstico de la enfermedad.<sup>44</sup> Además las células B no solo producen auto-anticuerpos si no también citocinas tales como INFγ e IL-4, las cuales pueden modular la respuesta inmune y por otra parte son células presentadoras de antígeno.<sup>45</sup> Por todo lo anterior las células B son un blanco atractivo para terapia biológica.

### Terapias de células B como blanco

En un inicio se consideró que las células T jugaban un papel importante en el comienzo de enfermedades autoinmunes, mientras que el papel de las células B estaba restringido solo a la producción de autoanticuerpos. Sin embargo estudios recientes sugieren que la célula B juega un papel importante en la fisiopatología y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como el Síndrome de Sjögren primario (pSS). En estas patologías las células B están sobre-estimuladas y producen títulos elevados de anticuerpos con diferentes especificidades.

La producción excesiva de anticuerpos por la activación de las células B es una característica del pSS, entre ellos niveles elevados de IgA, los cuales pueden mostrar actividad de factor reumatoide.<sup>46</sup>

Se han utilizado algunas moléculas de células B como blanco. Las que más se han empleado para la eliminación de las células B son los antígenos CD20, CD22 y el Factor Activador de la Familia TNF de células B (BAFF). El antígeno CD20 es una molécula transmembranal hidrofóbica con un peso molecular aproximado de 35 kDa que se encuentra en células pre-B, células B maduras pero no en células pro-B y células plasmáticas normales u otros tejidos. CD20 regula uno o más de los primeros pasos en el proceso de activación que están involucrados en el ciclo celular de inicio y diferenciación. Por las características anteriormente mencionadas hace que CD20 sea un blanco potencial de células B.<sup>47</sup>

Otra molécula que se ha empleado como blanco terapéutico mediante el uso de anticuerpos es CD22. La molécula CD22 es una sialoglucoproteína transmembranal restringida a células B la cual se hace presente durante los estadios tardíos de células B pro-B, se expresa en niveles bajos en células B inmaduras y a niveles altos en células B maduras y no se encuentra en células plasmáticas diferenciadas.<sup>48</sup>

BAFF es un factor importante para las células B, ya que les permite sobrevivir en la periferia, así como la repoblación de linfocitos B en sangre y glándulas salivales cuando estas son eliminadas por el uso de Rituximab en pacientes con síndrome de Sjögren y también está involucrado en la selección de células B promoviendo su resistencia de células transicionales hacia la apoptosis.<sup>49</sup>

### Terapias usando determinantes de células B como blancos

Actualmente se siguen utilizando terapias convencionales en el tratamiento del síndrome de Sjögren (pilocarpina, ciclosporina local e hidroxiclороquina), sin embargo estas no modifican el curso de la enfermedad. Rituximab es el único producto de origen biológico que se utiliza en la actualidad para el trata-

miento de pSS. Los estudios que se han realizado usando Rituximab sugieren que este es bien tolerado por los pacientes, induciendo una rápida disminución de células B en sangre y en glándulas salivales, mejorando la condición de los pacientes con involucramiento glandular.<sup>50</sup>

### Uso de anti-CD20: Rituximab

Uno de los pocos anticuerpos que se han utilizado en enfermedades autoinmunes como pSS es Rituximab. Este es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-ratón que se une al antígeno de membrana CD20 de células B inmaduras y maduras. Este fármaco produce una disminución profunda de las células B CD20<sup>+</sup> a través de varios mecanismos inmunológicos como son: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, citotoxicidad dependiente de complemento y la inducción de apoptosis. La molécula CD20 no es expresada en células pro-, pre-B o células plasmáticas. Por último Rituximab no interfiere con la producción de inmunoglobulinas.<sup>51</sup>

En un estudio retrospectivo inicial en 6 pacientes con pSS usando Rituximab, dos con linfoma asociado y cuatro con manifestaciones clínicas, tres de ellos tuvieron mejoría de resequead dos estabilizaron sus pruebas diagnósticas, cinco tuvieron mejoría en sus manifestaciones extraglandulares y por último uno de los dos pacientes con linfoma tuvo una remisión completa.<sup>52</sup>

Algunos estudios sugieren que su uso tiene un efecto benéfico en la resequead de las mucosas y las manifestaciones extraglandulares.<sup>53</sup>

En un estudio donde se usaron dos infusiones de Rituximab en 16 pacientes con pSS y se siguieron durante 36 semanas, el tratamiento induce una rápida disminución de todas las subpoblaciones de células B en sangre periférica y se mantuvo por al menos 1.5 meses, mientras que en las glándulas salivales fue de aproximadamente 12 meses.<sup>54</sup>

En otro estudio realizado con 16 pacientes con pSS tratados con Rituximab para linfoma o manifestaciones sistémicas, solo unos pocos mostraron mejoría en la resequead. Sin embargo el 80 % de los pacientes mejoraron en las manifestaciones extraglandulares. Rituximab fue efectivo en 4 de 5 pacientes con linfoma de células B. Se observaron efectos adversos en el 20 % de los 16 pacientes y uno desarrolló anticuerpos anti-anticuerpos quiméricos (Rituximab).<sup>55</sup>

En un estudio prospectivo reciente realizado por William St. Clair administró Rituximab a un grupo de 12 pacientes femeninos con Síndrome de Sjögren. Los resultados clínicos mostraron en este grupo de pacientes niveles modestos de alivio en la actividad de la enfermedad entre la semana 0 y 26. Sin embargo hubo algunas características clínicas que mostraron

mejoría, entre las cuales están: el nivel de sed, malestar oral y el nivel general de fatiga, sólo estas últimas mostraron significancia estadística. En las condiciones en las que no hubo mejora fueron: dolor de articulaciones, flujo de saliva ya fuera estimulado o no, producción de lágrimas y la resequedad de la superficie ocular.

Con respecto al curso de las células B después del tratamiento con Rituximab, los 12 pacientes mostraron 95 % de disminución de las células B sanguíneas entre las semanas 8 a 14, mientras que la cuenta de células B comenzó a incrementarse alrededor de la semana 26, en tanto que a la semana 52 los niveles de células B en sangre regresaron a un porcentaje de  $\geq 62$  % sobre los valores basales en 8 de 12 pacientes.

Se analizaron las poblaciones de células B en base a los marcadores CD38 y CD27 y se pudieron definir 6 diferentes subpoblaciones. En la comparación basal después de la administración de Rituximab los pacientes con pSS con respecto a los controles tenían un número mayor de células B transicionales, un menor número de células B de memoria, una elevación de los niveles de BAFF sérico y no hubo cambios en los títulos de anti-Ro/SSA y anti-La/SSB. Después de la terapia con anti-CD20 las células B que repoblaron la sangre periférica en los pacientes con pSS fueron principalmente transicionales con el fenotipo (CD38<sup>++</sup>CD27<sup>-</sup>) en la semana 16 (10.3 células/ $\mu$ l vs 21.4 células/ $\mu$ l basales; 65% del total de células B CD19<sup>+</sup>).<sup>56</sup>

En un estudio realizado en Francia, 16 pacientes con pSS activa tratados con Rituximab mostró resultados positivos al observarse una mejoría en los componentes mental y físico a las 12 semanas de iniciado el tratamiento y se mantuvo por 36 semanas.<sup>57</sup>

Uno de los primeros estudios prospectivos para evaluar la respuesta de pSS, usando Rituximab fue desarrollado en Holanda. La respuesta a este fármaco se hizo usando dos nuevos índices ESSDAI (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index) y ESSPRI (EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index). Se estudió una cohorte de 28 pacientes con pSS tratados con el anticuerpo monoclonal, seguidos por un periodo prolongado de tiempo. El promedio de la respuesta estandarizada fue mayor para los dos índices, pero un menor índice de flujo salival en todas las semanas de estudio, en la semana 16, después de esta semana los índices se fueron perdiendo.<sup>58</sup>

Aqrawi y col<sup>61</sup> en un estudio realizado en glándulas salivales pueden dar luz en la patogénesis de pSS además de evaluar la eficiencia de las estrategias terapéuticas actualmente aplicadas.

Entre las conclusiones importantes con respecto a la eficacia del uso de Rituximab en pSS fueron que en sus resultados los subtipos celulares más abundantes son células plasmáticas específicas de Ro52 y Ro60 y células plasmáticas de larga vida de las células B glandulares específicas de SSA, las cuales son CD20-negativas, y son afectadas por el tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab). Por lo que los autores sugieren una terapia adicional con anticuerpos monoclonales que tengan como blanco la población de células B activadas y con esto tener una terapia más efectiva. Además se ha observado que la eliminación de células B muestra alguna eficacia para las manifestaciones extraglandulares, las cuales incluyen: neuropatía periférica, crioglobulinemia y vasculitis.<sup>59</sup>

En el síndrome de Sjogren se necesita que las inmunoterapias sean probadas en un número mayor de estudios empleando un número pequeño de pacientes seguidos por periodos cortos de tiempo para poder confirmar un resultado prometedor en la mejoría de los pacientes con el síndrome. A pesar de los prometedores estudios iniciales, los estudios publicados en los últimos 18 meses han sido abrumadores, pequeños y sin mucho control, por lo que no se puede decir que se hayan hecho muchos avances en esta área.<sup>60</sup>

Una de las contradicciones con respecto al efecto benéfico que pudiera tener el uso de Rituximab en el curso de la enfermedad de pSS, es que existen discrepancias entre el efecto de una eliminación substancial de células B por el uso de anti-CD20 y la falta de un beneficio clínico concomitante. En este estudio se ensayó la persistencia de las poblaciones de células B que producían anticuerpo en las glándulas salivales parótidas de pacientes con síndrome de Sjögren, después del tratamiento con Rituximab. Se incluyeron 13 pacientes y cuatro sujetos control y se trataron con el fármaco o placebo. Los análisis del tejido de la parótida mostraron que el número de expansiones clonales fue mayor en pacientes con pSS sobre los controles. Estas expansiones clonales eran principalmente de células B que expresaban inmunoglobulina A y G. Rituximab no afectó de manera significativa estas expansiones clonales, mientras que a nivel periférico casi hubo una eliminación completa de células B. Grupos de células clonalmente relacionadas, tuvieron componentes los cuales fueron compartidos entre biopsias tomadas antes y después del tratamiento. Las frecuencias de mutación de las secuencias de las inmunoglobulinas de células clonalmente relacionadas en pacientes con pSS fueron mayores después del tratamiento. Combinada la carga mutacional de las secuencias de las inmunoglobulinas en el tejido en las células relacionadas clonalmente después del tratamiento con Rituximab y la relación de secuencias clonalmente relacionadas entre células productoras de IgG e IgA, los autores concluyen que la hipermutación somática local, cambio de isotipo y la diferenciación de las células secretoras de anticuerpo continua

ocurriendo en las células residuales del tejido después del tratamiento con Rituximab a pesar de una disminución en sangre periférica de células B. Solo faltaría por probar si estos eventos moleculares reflejan un incremento en la maduración de la afinidad local de las células B autorreactivas con especificidad antigénica para antígenos glandulares y potencial patogénico.

Entre las conclusiones de los autores, está que el tratamiento con Rituximab no afecta el incremento de la expansión clonal observada en las glándulas salivales de los pacientes con pSS. La presencia de células productoras de inmunoglobulina clonalmente relacionadas antes y después del tratamiento con Rituximab sugiere fuertemente que las células productoras de inmunoglobulina persisten en las glándulas salivales de los pacientes con pSS a pesar de la eliminación de células B a nivel sistémico.<sup>61</sup>

### **Consecuencias Inmunológicas de la terapia con Rituximab**

Una posibilidad evidente debida al periodo de eliminación de las células B a nivel periférico por el uso de Rituximab es el riesgo de infección. Una consecuencia inmediata es el efecto de poder mantener los títulos de inmunoglobulinas y la habilidad de responder a nuevos antígenos. Dos estudios clínicos han tratado de responder estas interrogantes.

Un estudio conducido en pacientes con artritis reumatoide (AR) activa, divididos en dos grupos, el primer grupo fue vacunado 4-8 semanas después del tratamiento con Rituximab (subgrupo temprano) y otro 6-10 meses después del tratamiento (subgrupo tardío). El segundo grupo consistió de pacientes tratados con metotrexato. Los dos grupos fueron inmunizados con virus de influenza, midiendo la respuesta por medio de la media geométrica del título de anticuerpos. El estudio muestra que la respuesta humoral a la vacuna de influenza en pacientes con AR está severamente bloqueada comparada con aquellos pacientes que recibieron metotrexato y los sujetos controles. Sin embargo este bloqueo es temporal ya que hay un aumento significativo de la media geométrica del título de anticuerpos después de la vacunación en el subgrupo de Rituximab tardío, mientras que en el subgrupo temprano no hubo un incremento. Por otra parte las células B de sangre periférica que se recuperan después del tratamiento con Rituximab consisten principalmente de células B inmaduras y vírgenes. En conclusión los autores recomiendan la vacunación anual de pacientes con AR a pesar de la disminución de la respuesta inmune humoral, ya que esta última se restaura parcialmente en los siguientes 6-10 meses después del tratamiento con Rituximab.<sup>62</sup>

En un segundo estudio se trató de identificar los factores de riesgo de eventos de infección severa (SIEs) siguiendo a los doce meses de administración de Rituximab. Se estudiaron 69

pacientes, de los cuales 55 recibieron una dosis de tratamiento, 10 dos dosis y 4 recibieron 3. Durante el tratamiento 12 pacientes tuvieron al menos un evento de infección severa (SIE, por sus siglas en inglés) durante o después de la administración de Rituximab (17.4 % de los pacientes), todos fueron infecciones bacterianas (*S. pneumonia*, *E. coli* y *H. influenzae*) o infecciones bacterianas sospechosas. La tasa de infección severa fue de 18.7 por 100 pacientes por año. A los 12 meses de iniciada la terapia con el anticuerpo 5 pacientes murieron de infecciones (5/12). De estos últimos ninguno había recibido la vacuna de neumococo y todos recibieron prednisolona al mismo tiempo que Rituximab.

Por último el estudio arroja los siguientes factores de riesgo en pacientes tratados con Rituximab: Dosis altas de corticoesteroides (> 15 mg/día), insuficiencia renal, un nivel bajo de IgG y una cuenta baja de células B CD19+. También sugieren la aplicación de la vacuna de neumococo de todos los pacientes 3 o 4 semanas antes de la primera dosis de Rituximab, así como limitar la dosis de corticoesteroides por debajo de 15 mg/ml o disminuir rápidamente la dosis de los esteroides.<sup>63</sup>

En resumen, Rituximab puede afectar la generación de anticuerpos en una respuesta de memoria o hacia un antígeno nuevo, y la eliminación de células B previo a la vacunación compromete la habilidad del sistema inmune para montar una respuesta humoral adecuada. Por otra parte, la presencia de células B de memoria pre-existentes y células plasmáticas de larga vida en contra de los antígenos de la vacuna se asocia con la habilidad de montar una respuesta por anticuerpos adecuada, comparada con los antígenos en una primera inmunización, una posible explicación a esto es que estas células habitan en lugares protegidos, lo que las vuelve resistentes al tratamiento con Rituximab. Una evidencia de esto es la observación hecha por Cambridge y col. en la cual los títulos de anticuerpos anti-microbianos, no modifican su título después del tratamiento con Rituximab, lo cual refleja respuestas por células B preexistentes.<sup>64</sup>

Se ha observado la presencia de interferón tipo 1 y de células productoras de interferón en glándulas salivales de pacientes con pSS.<sup>65</sup> En un estudio realizado por Emamian demostraron que el interferón tipo I es importante en el síndrome de Sjögren no sólo a nivel glandular sino también a nivel sistémico en la enfermedad SLE. También mostraron que la presencia del IFN es importante en pacientes con autoanticuerpos, lo que sugiere una relación entre IFN tipo 1 y la activación de células B.<sup>68</sup>

### **BAFF**

BAFF es una proteína transmembranal tipo II (32 kDa). La forma biológicamente activa es trimérica.<sup>67</sup> BAFF es producido principalmente por monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B, aunque también es producido por células no-linfoideas

como los astrocitos, sinoviocitos y células epiteliales.<sup>68</sup>

BAFF promueve la sobrevivencia y secreción de anticuerpos en las células B. Las células B son más dependientes de este factor para su sobrevivencia que células B alorreactivas.<sup>69</sup> En pacientes con síndrome de Sjögren los niveles de BAFF correlacionan con los niveles de anticuerpos anti-SSA/SSB y factor reumatoide. La sobreexpresión de BAFF está asociada con anormalidades de células B en síndrome de Sjögren, tales como distribución de células B aberrante, hiperactividad y producción de autoanticuerpos.<sup>70</sup>

La expresión de BAFF también se encuentra incrementada en glándulas salivales de pacientes con el síndrome, comparados con los controles. En esta patología BAFF también es expresado por las células T, B y células salivales además de monocitos y células dendríticas. La expresión aberrante de BAFF en las glándulas salivales impacta exclusivamente a las células B. De importancia es el hecho de que la secreción de BAFF es estimulada principalmente por los interferones (IFNs).<sup>71</sup>

Se ha demostrado que IFN tipo I induce la expresión de BAFF en cultivo de monocitos y células epiteliales de glándulas salivales de pacientes con pSS. Esta citocina puede inducir la estimulación policlonal de células B lo cual resulta en una alta producción de autoanticuerpos y una reacción antígeno-anticuerpo incrementada lo cual aumenta el consumo de complemento.<sup>66</sup>

Una posibilidad de terapia es el bloqueo de la secreción de interferones a través del uso de hidroxicloroquina (HCQ), la mayoría de las drogas reportadas para el tratamiento de los síntomas de resequecedad en pacientes con pSS en general tienen un efecto placebo por lo que no mejoran la función glandular. El uso de HCQ mejora significativamente la producción de saliva, este efecto se observa mejor en pacientes. Sin embargo en otros estudios controlados y prospectivos no se observaron beneficios claros con el uso de hidroxicloroquina (dolor muscular y de articulaciones, fatiga).<sup>72</sup>

BAFF es un agente terapéutico de particular importancia. Se ha diseñado un anticuerpo: Belimumab, el cual es un anticuerpo monoclonal anti-BAFF y que solo reconoce BAFF, sin embargo sólo se ha probado en Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) con buenos resultados mientras que en síndrome de Sjögren hay tres diferentes clases de antagonistas de BAFF los que se encuentran en varios estadios del desarrollo clínico. Los bloqueadores selectivos de BAFF previenen la interacción de BAFF con su receptor. Las drogas que se incluyen en estos ensayos clínicos son un anticuerpo contra BAFF (anti-BLys, Belimumab o Lymphostat B) y una proteína que consiste de Fc de inmunoglobulina humana fusionada al dominio extracelular de BAFF-R (Briobacept, BAFF-R-Ig, BR3-Fc).<sup>73</sup>

Dada la importancia de BAFF en las anormalidades de las células B vistas en pSS, los ensayos clínicos con anti-BAFF deben ser de gran interés pero se requieren de estudios inmunológicos posteriores antes de ensayos clínicos en humanos.<sup>74</sup>

Por último, el uso de anti-CD20 disminuye las células B de las glándulas salivales de pacientes con pSS, estos estudios sugieren que Rituximab puede mejorar de manera subjetiva las manifestaciones extraglandulares. Los niveles basales séricos de BAFF correlacionan de manera inversa con la duración de la reducción de las células B, mientras mayores sean los niveles de BAFF menor es la carencia de células B. La repoblación de células B debe ser modulada por BAFF a través de los efectos de su vida útil.<sup>75</sup> La influencia de BAFF en el regreso de las células B es soportado por el hecho de que las células B que infiltran las glándulas salivales no solo expresan receptores BAFF sino que también tienen la habilidad de sintetizar esta citocina.<sup>76</sup> Algo relevante es el hecho de que el efecto benéfico de la disminución de células B puede ser compensado por un efecto antiapoptótico de células B que reemergen. Por lo que se ha observado que a mayores sean los niveles de BAFF antes del tratamiento menor es la duración del abatimiento de células B. Por lo anterior si Rituximab se aplica como estrategia de tratamiento para pSS se requiere un conocimiento más profundo de los niveles de BAFF que pueden ayudar en la aplicación de las dosis y frecuencia de la aplicación de Rituximab.<sup>77</sup> Por último un incremento en los niveles de BAFF que se han descrito después del tratamiento con Rituximab puede producir un efecto no deseado, afectando la tolerancia de la célula B y generando células B auto-reactivas.<sup>78</sup>

## Conclusiones

No hay duda de que el síndrome de Sjögren es una enfermedad en la cual las células B juegan un papel clave en el desarrollo de la enfermedad y algunas moléculas que se encuentran en la superficie de las células B pueden ser el blanco de algunas terapias con anticuerpos monoclonales. Aunque no se puede negar la importancia de la participación de las células T. El Rituximab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el marcador de células B CD20, mejora anormalidades objetivas y subjetivas en pacientes con pSS activo. Las terapias mediante las cuales se puedan eliminar las células B anormales pueden ser efectivas previniendo la progresión hacia neoplasias y en el mejoramiento de manifestaciones extraglandulares severas que están relacionadas con la producción exagerada de anticuerpos (hipergammaglobulinemia), crioglobulinemia, artritis y vasculitis.

El factor activador de células B de la familia del TNF se ha visto

que juega un papel muy importante en la sobrevivencia de la célula B y por lo tanto posiblemente esté implicado en la patogénesis de la autoinmunidad y dada la importancia de BAFF en las anomalías observadas en pSS, sin embargo se requiere de ensayos clínicos con tratamientos utilizando anticuerpos bloqueadores de BAFF, los cuales pueden ser de gran interés, pero se requieren estudios clínicos cuidadosos que permitan validar el uso de estos anticuerpos antes de probarlos en humanos.

Como se ha discutido anteriormente algunas anomalías en las células B han sido caracterizadas en el síndrome de Sjögren. Por lo que un mejor conocimiento de las poblaciones de células B implicadas en la enfermedad mejoraría las terapias dirigidas en contra de estas.

## Referencias

1. Haury M, Sundblad A, Grandien A, Barreau C, Coutinho A, Barreau C. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol.* 1997; 27(6): 1557-63.
2. Hooijkaas H, Benner R, Pleasants JR, Wostmann BS. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. *Eur J Immunol.* 1984; 14(12): 1127-30.
3. Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest.* 2007; 117(3): 712-18.
4. Madi A, Hecht I, Bransburg-Zabary S, Merbl Y, Pick A, Zucker-Toledano M, et al. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(34): 14484-89.
5. Avrameas S, Ternynck T, Tsonis IA, Lymberi P. Naturally occurring Bcell autoreactivity: a critical overview. *J Autoimmun.* 2007; 29(4): 213-18.
6. Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, Shaw PX, et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(5): 1335-49.
7. Fu M, Fan PS, Li W, Li CX, Xing Y, An JG, et al. Identification of poly-reactive natural IgM antibody that recognizes late apoptotic cells and promotes phagocytosis of the cells. *Apoptosis.* 2007; 12(2): 355-62.
8. Tuominen A, Miller YI, Hansen LF, Kesaniemi YA, Witztum JL, Hökkö S. A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(9): 2096-2102.
9. Tarlinton DM, McLean M, Nossal GJ. B1 and B2 cells differ in their potential to switch immunoglobulin isotype. *Eur J Immunol.* 1995; 25(12): 3388-93.
10. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(1): 34-46.
11. Bournia VK, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjogren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun.* 2012; 39(1): 15-26.
12. Pisetsky DS. Antinuclear Antibodies in Rheumatic Disease: A Proposal for a Function-Based Classification. *Scand J Immunol.* 2012; 76(3): 223-28.
13. Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, et al. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. 2012; *PLoS One* 7(5): e35296.
14. Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Tobón GJ, Pers JO, Jousse-Joulin S, Saraux A. B cells in Sjögren's syndrome: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *J Autoimmun.* 2012; 39(3): 161-67.
15. Hardy RR. B-1B Cell Development. *J Immunol.* 2006; 177(5): 2749-54.
16. Choi YS, Baumgarth N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med.* 2008; 205(13), 3053-64.
17. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol.* 2009; 182(7): 4116-26.
18. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b Cells Exhibit Distinct Developmental Requirements and Have Unique Functional Roles in Innate and Adaptive Immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity.* 2005; 23(1): 7-18.
19. Alugupalli KR, Gerstein RM. Divide and conquer: division of labor by B-1 B cells. *Immunity.* 2005; 23(1): 1-2.
20. Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends in immunol.* 2009; 30(6): 277-85.
21. Von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat immunol.* 2009; 11(1): 14-20.
22. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19(1): 595-621.
23. LeBien T W, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008; 112(5): 1570-80.
24. Antin JH, Emerson SG, Martin P, Gadol N, Ault KA. Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J Immunol.* 1986; 136(2): 505-10.
25. Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(11): 2105-11.

26. Hardy RR, Hayakawa K, Shimizu M, Yamasaki K, Kishimoto T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science*. 1987; 236(4797): 81-83.
27. Casali P, Burastero SE, Nakamura M, Inghirami G, Notkins AL. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science*, 1987; 236(4797): 77-81.
28. Liu YJ, Arpin C. Germinal center development. *Immunol Rev*. 1997; 156(1): 111-26.
29. Liu YJ, Banchereau J. The paths and molecular controls of peripheral B-cell development. *Immunologist*. 1996; 4: 55-66.
30. Ody C, Jungblut-Ruault S, Cossali D, Barnet M, Urrand-Lions M, Imhof BA, et al. Junctional adhesion molecule C (JAM-C) distinguishes CD27+ germinal center B lymphocytes from non-germinal center cells and constitutes a new diagnostic tool for B-cell malignancies. *Leukemia*. 2007; 21(6): 1285-93.
31. Steiniger B, Timphus EM, Jacob R, Barth PJ. CD27+ B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. *Immunology*. 2005; 116(4): 429-42.
32. Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?. *J Immunol*. 2007; 179(1): 13-19.
33. Arce E, Jackson DG, Gill MA, Bennett LB, Banchereau J, Pascual V. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2001; 167(4): 2361-69.
34. Arce S, Luger E, Muehlinghaus G, Cassese G, Hauser A, Horst A, et al. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(6): 1022-28.
35. Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig J B, Thompson KM. Bm1- Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol*. 2001a; 167(7): 3610-18.
36. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun*. 2011; 36(3): 228-38.
37. Kaminski DA, Wei C, Quian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol*. 2012; 3: 1-15.
38. Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, et al. Identification of transitional Type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(7): 2280-88.
39. Sims TG, Ettinger R, Shirota Y, Yarburo CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005; 105(11): 4390-98.
40. Descatoire M, Weill JC, Reynaud CA, Weller S. A human equivalent of mouse B-1 cells?. *J Exp Med*. 2011; 208(13): 2563-64.
41. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1285(1): 97-114.
42. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells are CD3-: A reply to "A human equivalent of mouse B-1 cells? And "The nature of circulating CD27+ CD43+ B cells". *J Exp Med*. 2011b; 208: 2566-2569.
43. Perez-Andres M, Grosserichter-Wagener C, Teodosio C, van Dongen JJM, Orfao A, van Zelm MC. The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med*. 2011; 208(13): 2565-66.
44. Pers JO, Youinou P. Are the B cells cast with the leading part in the Sjogren's syndrome scenario? *Oral diseases*. 2014; 20(6): 529-37
45. Youinou P, Taher TE, Pers JO, Mageed RA, Renaudineau Y. B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. *Arthritis & Rheumatism*. 2009; 60(7), 1873-80.
46. Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Tobón GJ, Pers JO, Jousse-Joulin S, Saraux A. B cells in Sjögren's syndrome: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *J Autoimmun*. 2012; 39(3): 161-67.
47. Garberg H, Jonsson R, Brokstad KA. The serological pattern of autoantibodies to the Ro52, Ro60, and La48 autoantigens in primary Sjogren's syndrome patients and healthy controls. *Scand J Rheumatol*. 2005; 34(1): 49-55.
48. Gordon TP, Bolstad AI, Rischmueller M, Jonsson R, Waterman SA. Autoantibodies in primary Sjogren's syndrome: new insights into mechanisms of autoantibody diversification and disease pathogenesis. *Autoimmunity*. 2001; 34(2): 123-32.
49. Bendaoud B, Pennec YL, Lelong A, Le Noac'h JF, Magadur G, Jouquan J, et al. IgA-containing immune complexes in the circulation of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 1991; 4(1): 177-84.
50. Tobón GJ, Pers JO, Youinou P, Saraux A. B cell-targeted therapies in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*. 2010; 9(4): 224-28.
51. Faurschou M, Jayne DR. Anti-B cell antibody therapies for inflammatory rheumatic diseases. *Annual review of medicine*. 2014; 65: 263-78.
52. Pers JO, Devauchelle V, Daridon C, Bendaoud B, Berre RL, Bordron A et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of Rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(5): 1464-77.
53. Mariette X, Gottenberg JE. Pathogenesis of Sjogren's syndrome and therapeutic consequences. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22(5): 471-77.

54. Saraux A. The point on the ongoing B-cell depleting trials currently in progress over the world in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(9): 609-14.
55. Gottenberg JE, Guillevin L, Lambotte O, Combe B, Allanore Y, Cantagrel A, et al. Tolerance and short term efficacy of Rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases. *Ann rheum dis.* 2005; 64(6): 913-20.
56. Devauchelle-Pensec V, Pennec Y, Morvan J, Pers JO, Daridon C, Jousse\_Joulin S, et al. Improvement of Sjögren's syndrome after two infusions of Rituximab (anti-CD20). *Arthritis Care & Research.* 2007; 57(2): 310-317.
57. Seror R, Sordet C, Guillevin L, Hachulla E, Masson C, Ittah M, et al. Tolerance and efficacy of Rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(3): 351-57.
58. St Clair EW, Levesque MC, Prak ETL, Vivino FB, Alappat CJ, Spychala ME, et al. Rituximab Therapy for Primary Sjögren's syndrome: An Open-Label Clinical Trial and Mechanistic Analysis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(4): 1097-1106.
59. Devauchelle-Pensec V, Morvan J, Rat AC, Jousse-Joulin S, Pennec Y, Pers JO, et al. Effects of Rituximab therapy on quality of life in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2010; 29(1): 6-12.
60. Meiners PM, Arends S, Brouwer E, Spijkervet FK, Vissink A, Bootsma H. Responsiveness of disease activity indices ESSPRI and ESSDAI in patients with primary Sjögren's syndrome treated with Rituximab. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(8): 1297-302.
61. Agrawi LA, Skarstein K, Øijordsbaken G, Brokstad KA. Ro52 and Ro60-specific B cell pattern in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2013; 172(2): 228-37.
62. Coca A, Sanz I. Updates on B-cell immunotherapies for systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2012; 24(5): 451-56.
63. Hamza N, Bootsma H, Yuvaraj S, Spijkervet FK, Haacke EA, Pollard RP, et al. Persistence of immunoglobulin-producing cells in parotid salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome after B cell depletion therapy. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(11): 1881-87.
64. Van Assen S, Holvast A, Benne CA, Posthumus MD, van Leeuwen MA, Voskuyl AE, et al. Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with Rituximab. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(1): 75-81.
65. Heusele M, Clerson, P, Guery B, Lambert M, Launay D, Lefevre G, Morell-Dubois S, Maillard H, Le Gouvellec N, Hatron P-Y and Hachulla E. Risk factors for severe bacterial infections in patients with systemic autoimmune diseases receiving rituximab. *Clin Rheumatol.* 2014; 33: 799-805.
66. Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC. Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following Rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(3): 723-32.
67. Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwsen CG. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72: 728-735.
68. Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ, Grandits M, Baechler EC, Gaffney PM, et al. Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes and immunity.* 2009; 10(4): 285-96.
69. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med.* 1999; 189(11): 1747-56.
70. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. In *Seminars in immunology.* 2006; 18(5): 263-75. Academic Press.
71. Mariette X, Gottenberg JE. Pathogenesis of Sjögren's syndrome and therapeutic consequences. *Curr Opin Rheumatol.* 2010; 22(5): 471-77.
72. Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62(2): 168-71.
73. Lavie F, Miceli-Ricard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. B-cell Activating Factor of the Tumour Necrosis Factor Family Expression in Blood Monocytes and T Cells from Patients with Primary Sjögren's syndrome. *Scandinavian J Immunol.* 2008; 67(2): 185-92.
74. Rihl M, Ulbricht K, Schmidt RE, Witte T. Treatment of sicca symptoms with hydroxychloroquine in patients with Sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 2009; 48(7): 796-99.
75. Saraux A. The point on the ongoing B-cell depleting trials currently in progress over the world in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(9): 609-14.
76. Looney RJ. B cell-targeted therapies for systemic lupus erythematosus. *Drugs.* 2010; 70(5): 529-40.
77. Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity.* 2004; 20(6): 785-98.
78. Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Berre RL, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(4): 1134-44.