

Tesis Doctoral

# Síndrome de Sjögren: relevancia del sistema VIP/VPAC en el mantenimiento y pérdida de la homeostasis tisular

Hauk, Vanesa Cintia

2015

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

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

Cita tipo APA:

Hauk, Vanesa Cintia. (2015). Síndrome de Sjögren: relevancia del sistema VIP/VPAC en el mantenimiento y pérdida de la homeostasis tisular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5795\\_Hauk](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5795_Hauk)

Cita tipo Chicago:

Hauk, Vanesa Cintia. "Síndrome de Sjögren: relevancia del sistema VIP/VPAC en el mantenimiento y pérdida de la homeostasis tisular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5795\\_Hauk](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5795_Hauk)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**Síndrome de Sjögren:  
Relevancia del sistema VIP/VPAC en el mantenimiento y pérdida de la  
homeostasis tisular**

*Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Biológica*

**Vanesa Cintia Hauk**

Directora de Tesis: Dra. Claudia Pérez Leirós  
Consejera de Estudios: Dra. Laura Alché

Buenos Aires, 2015

Fecha de Defensa: 01/06/2015

## Agradecimientos

---

A lo largo de estos años fueron muchos los que compartieron, me acompañaron y formaron parte en este trayecto.

En primer lugar quiero agradecerle a mi directora, Cali, las palabras quedan cortas para expresar todo lo que me enseñó en este camino de la ciencia. Por la confianza que depositó en mí desde el principio, por tener siempre la palabra justa y por el apoyo constante en todas las etapas que fuimos transitando durante esta tesis, que fueron muchas.

A Rochy, por sus consejos de trabajo pero también de vida. Gracias por estar siempre ahí dando fuerzas para seguir.

A mis compañeros de labo: los de siempre, los que se fueron y los nuevos que llegaron. Gracias por su compañerismo, siempre pude contar con cada uno de ustedes cuando necesité una ayuda. Lau, mi 'hermanita' de la ciencia, Esteban, nuestro genio de la computación, Marian, mi amiga de mates y mañanas, Dai, mi amiguita de confianza, Guille, la chispita del equipo, Dani, la 'alegría' del labo y Lu, la última semillita VIP: gracias por hacer que el día a día fuese tan divertido. Lu, Mario y Vale, mis iniciadores en el trabajo de mesada, gracias por tanta paciencia en mis primeros años. Fátima y Liz que se están sumando al labo, por su buena onda.

Al Dr. Matthew Hoffman, quiero agradecerle por abrirme las puertas de su laboratorio en el NIDCR, NIH, Bethesda, EEUU y enseñarme las técnicas sobre cultivos de glándulas submaxilares embrionarias. Porque desde el primer día que llegué me incorporaron a todas las actividades del grupo que permitieron que la estadía fuese enriquecedora, más allá de la mesada. En especial, también quiero agradecerle a Patricia por 'adoptarme' como hermana durante toda mi estadía.

Al Dr. Roberto Meiss de la Academia Nacional de Medicina, por brindarme su experiencia y dedicación en el análisis histológico de las glándulas.

Al Dr. Osvaldo Hubscher y la Dra. Alicia Eimon, de la Unidad de Reumatología del CEMIC, que seleccionaron y realizaron el seguimiento de los pacientes con SSp que formaron parte del estudio, por su interés y dedicación a la investigación clínica y la enriquecedora discusión de los resultados.

A la Dra. Verónica García y todo su grupo, por la buena predisposición y ayuda que me dieron cada vez que fui a golpearles la puerta. A Bel, Anita, Delfi, Rodri, Javi y Vir, gracias por las charlas compartidas y por ser tan buenos compañeros.

A la Dra. Alcira Nesse y todo su grupo quiero agradecerle por la constante colaboración en gran parte de esta tesis. A Maru, Romi y Shirley, por las charlas compartidas entre desayunos, almuerzo y meriendas.

## Agradecimientos

---

A todo el personal del Bioterio, en especial a Sabrina y Alejandra, por estar dispuestas a colaborar con sus conocimientos en las nuevas técnicas y modos de cría de las distintas cepas murinas.

A todo el Departamento de Química Biológica de la FCEyN por la ayuda y afecto diario.

Al CONICET, la UBA y la AGENCIA, por el financiamiento brindado para la realización de esta tesis doctoral.

En lo personal quisiera agradecer a mis amigas facultativas, Cami y Maru, porque aunque nos veamos de vez en cuando todo sigue como cuando nos veíamos todos los días, profesores por medio, y a mis amigas de siempre, Lali, Sole, Sabri, y Clari por crecer conmigo =)

A mi familia, la mejor familia que uno puede tener.

Mamá, Papá y Sabri, un tesoro que siempre voy a llevar conmigo. Gracias por escucharme siempre aun en esos momentos en que no paraba de renegar. Gracias por no permitir que baje los brazos... Gracias como siempre!

Al gordo, ya no tan gordo, Ale, por ser mi compañero de vida, por acompañarme en todo este camino apoyando todas mis decisiones y sobretodo por hacerme feliz. Te amo!

A Sofi, nuestra pupina, porque con su sonrisa nos alegro la vida y no existen palabras para explicar el amor que nos hace sentir y la fuerza que nos da para seguir. Te amamos chiquitina!

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
INTRODUCCION	8
Capítulo 1 – Síndrome de Sjögren	8
1.1 Características clínicas del Síndrome de Sjögren	8
1.2 Mecanismos etiopatogénicos del Síndrome de Sjögren primario	11
1.2.1 Papel de las células epiteliales glandulares en la patogénesis del SSp	12
1.3 Modelos murinos de exocrinopatía autoinmune	15
1.3.1. Ratones diabéticos no obesos (NOD)	17
1.4 Aspectos fisiopatológicos y del desarrollo de las glándulas salivales en relación con el Síndrome de Sjögren	19
1.4.1 Estructura de las glándulas salivales y regulación de la función	19
1.4.2 Desarrollo embrionario de la glándula salival	21
Capítulo 2 – Mantenimiento y ruptura de la homeostasis tisular	25
2.1 Homeostasis tisular: Apoptosis y remoción de cuerpos apoptóticos	25
2.2 Participación de los macrófagos en el mantenimiento de la homeostasis tisular	27
2.3. Ruptura de la homeostasis: Inflamación crónica y autoinmunidad	29
Capítulo 3 – Péptido Intestinal Vasoactivo	32
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Modelos Murinos	39
Pacientes con Síndrome de Sjögren Primario (SSp) y voluntarios sanos	39
Línea celular de glándula submaxilar humana (HSG)	40
PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	41
1. Cultivos primarios con células de ratones	41
1.1 Macrófagos peritoneales	41
1.2 Acinos de glándula submaxilar	41
1.3 Co-cultivos de macrófagos peritoneales y acinos de glándula submaxilar	42
1.4 Cultivos de glándulas submaxilares embrionarias	42

2. Medición de flujo salival y electrolitos en saliva de ratones	43
3. Cultivo de línea celular humana	44
4. Aislamiento de células mononucleares totales de sangre periférica (MNT) y monocitos humanos	44
4.1 Co-cultivos de células epiteliales de glándula submaxilar (HSG) y células mononucleares de pacientes con Síndrome de Sjögren o controles	45
5. Ensayo de fagocitosis	45
5.1. Fagocitosis por macrófagos murinos	45
5.2. Fagocitosis por monocitos humanos	46
6. Ensayos funcionales sobre la línea celular HSG	46
6.1 Ensayos de reparación de la herida	46
6.2. Ensayo de diferenciación celular a acinos	46
7. RT-PCR	47
7.1 Extracción de ARN	47
7.2 Retro-transcripción	47
7.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	47
7.4 Electroforesis en gel de agarosa y semicuantificación de los productos de RT-PCR	49
8. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	49
9. Determinación de nitritos	49
10. ELISA para citoquinas	50
11. RIA para PGE2	50
12. Estudios histológicos	51
12.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina	51
13. Inmunofluorescencia	51
14. Citometría de flujo	52
14.1 Inmunofluorescencia de superficie directa	52
14.2 Inmunofluorescencia intracitoplasmática para proteínas	52
15. Determinación de la concentración de proteínas	53
16. Análisis estadístico	53
 RESULTADOS	 55
 CAPITULO 1	
PARTE I - Expresión del sistema VIP/VPAC en glándulas submaxilares de ratones NOD adultos	55
PARTE II - Expresión y actividad del sistema VIP/VPAC durante el desarrollo de glándulas salivales	61
PARTE III - Caracterización funcional e histológica de las glándulas salivales de ratones deficientes en VIP	68
PARTE IV - Fagocitosis de células acinares apoptóticas por macrófagos de ratones NOD: Efecto inmunomodulador de VIP	73

## CAPITULO 2

PARTE I - Expresión del sistema VIP/VPAC y efectos del VIP en monocitos de pacientes con SSp	78
PARTE II - Fagocitosis de células epiteliales apoptóticas por monocitos de pacientes con síndrome de Sjögren primario: Efecto inmunomodulador de VIP	81
PARTE III - Interacción de células epiteliales de glándula submaxilar humana con monocitos de SSp y modulación por VIP	86
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	93
Conclusiones finales	104
BIBLIOGRAFÍA	107

## Abreviaturas

---

ACh	Acetilcolina
AECC	<i>American European Consensus Criteria</i>
AMPc/PKA	Adenosinmonofosfato cíclico/ proteína quinasa A
AR	Artritis reumatoidea
AQP	Acuaporina
BAFF	Factor activador de células B
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
Cldn8	Claudina 8
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E-cad	E-cadherina
ESSDAI	<i>EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index</i>
EDDPRI	<i>EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index</i>
EULAR	<i>European League against rheumatism</i>
GAPDH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HSG	Línea celular de glándula submaxilar humana
IL	Interleuquina
KO	<i>Knock-Out</i>
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisácarido
MC	Medio condicionado
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos
MMP	metaloproteinasa
MNT	células mononucleares totales
NFκB	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NOD	ratones diabéticos no obesos
NOS	óxido nítrico sintasa
PAC	receptor de PACAP
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria



## Abreviaturas

---

PGE2	prostaglandina E2
PSP	proteína secretoria de parótida
S29	proteína ribosomal S29
<i>scid</i>	inmunodeficiencia combinada severa
SMG	glándula submaxilar
SMGc	proteína c de glándula submaxilar
SSp	Síndrome de Sjögren primario
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Célula T regulatoria
Tubb3	Tubulina beta 3
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VPAC1	Receptor 1 de péptido intestinal vasoactivo
VPAC2	Receptor 2 de péptido intestinal vasoactivo
WT	<i>Wild type</i>

# RESUMEN

### **Síndrome de Sjögren: Relevancia del sistema VIP/VPAC en el mantenimiento y pérdida de la homeostasis tisular**

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por una progresiva disfunción secretoria con escasa correlación con el daño tisular en las glándulas. No hay evidencias claras sobre su patogenia y el tratamiento es sintomático con un alivio meramente marginal. Se ha propuesto que previo al ataque autoinmune hay una pérdida en el equilibrio homeostático de las glándulas con activación de células acinares que podrían aumentar la susceptibilidad del tejido a una respuesta autoinmune. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son un modelo muy interesante para estudiar el SS ya que desarrollan una disfunción secretoria con pérdida temprana de la homeostasis glandular con una moderada infiltración linfocitaria. Los macrófagos, son células plásticas, que tienen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis tisular por su función fagocítica para la remoción de productos de degradación y células apoptóticas, función que realizan en forma 'silenciosa' y rápida evitando una respuesta inflamatoria deletérea. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un neurotransmisor autonómico pro-secretorio y vasodilatador, que tiene efecto trófico sobre acinos y, junto a sus receptores VPAC, se localiza en células inmunes con un marcado efecto anti-inflamatorio e inmunomodulador.

Basados en los efectos pro-secretorios y tróficos del VIP sobre los acinos como de sus propiedades anti-inflamatorias hipotetizamos que la liberación local de VIP por diversos tipos celulares podría modular procesos apoptóticos e inflamatorios en la interacción de células inmunes con células epiteliales contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis tisular glandular. Asimismo, hipotetizamos que estos mecanismos modulados por VIP se verían alterados en condiciones de ruptura de la homeostasis tisular.

En este trabajo en primer lugar se estudio el papel del VIP en el mantenimiento de la homeostasis glandular en el modelo murino NOD. Se observo que hay una disminución en la expresión de VIP en las glándulas salivales de ratones NOD que no se observa en

la cepa control. La pérdida en la expresión del VIP endógeno se ve asociada con la pérdida de células acinares. Por otro lado, el 'clearance' de acinos apoptóticos por macrófagos se encuentra desregulado en los macrófagos NOD. Sin embargo durante el proceso fagocítico dichos macrófagos adquieren un perfil alternativo de activación.

Finalmente, se analizó la contribución del sistema VIP/VPAC en un modelo *in vitro* de co-cultivo de células mononucleares totales o monocitos de pacientes con síndrome de Sjögren y células epiteliales de glándula submaxilar (HSG). En primer lugar caracterizamos el sistema VIP/VPAC en monocitos y su capacidad fagocítica de células HSG apoptóticas donde observamos que los monocitos de pacientes con SS presentan incrementada la expresión del receptor VPAC2 ausente en los monocitos controles y su capacidad fagocítica se ve alterada. No solo fagocitan en menor cantidad sino que adquieren un perfil fenotípico inflamatorio que no puede ser modulado por VIP. En los co-cultivos se estudió el perfil funcional y fenotípico de ambos tipos celulares luego de la interacción. Nuestros resultados indican que la interacción puede modular tanto a las células epiteliales como a los monocitos contribuyendo a la generación de un microambiente proinflamatorio, donde el VIP fue capaz de modular parcialmente dicho microambiente.

**Palabras clave:** síndrome de Sjögren – homeostasis glandular – péptido intestinal vasoactivo- macrófagos regulatorios- fagocitosis – células epiteliales de glándula submaxilar

### **Sjögren's Syndrome: Relevance of the VIP/VPAC system to homeostasis maintenance and loss**

Sjögren's Syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease characterized by a deep secretory dysfunction that correlates poorly with moderate gland damage. SS pathogenesis is still not clearly elucidated and the treatment is symptomatic. It has been proposed that homeostatic loss and acinar activation in the glands precedes the autoimmune response. Non obese diabetic mice (NOD) are a suitable model to study SS since they develop secretory dysfunction with early gland homeostasis loss and a moderate mononuclear infiltration of submandibular glands. Macrophages are plastic cells with a central role in tissue homeostasis maintenance due to their phagocytic function to 'silently' and rapidly remove apoptotic cells to prevent an inflammatory deleterious response. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is an autonomic neurotransmitter with secretory and vasodilator effects that exerts trophic effects on acini and, along with its VPAC receptors, localizes in immune cells with a strong anti-inflammatory and immunomodulatory effect.

Based on the pro-secretory and trophic activities of VIP on acini as well as its anti-inflammatory effect we hypothesized that the local release of VIP by various cell types could modulate inflammatory and apoptotic processes at the immune-epithelial cell interaction contributing to tissue homeostasis maintenance. We hypothesized that these VIP-modulated mechanisms could be altered in homeostasis loss conditions.

In this work we first studied the role of VIP in gland homeostasis maintenance in the NOD model. We observed a reduced expression of VIP in salivary glands of NOD mice compared with control mice. The loss of VIP expression was associated with reduced number of acini. Moreover, apoptotic cell clearance by NOD macrophages was defective but the cells acquired an alternative activation profile after phagocytosis.

Finally, the contribution of VIP/VPAC system in an *in vitro* model of immune-epithelial interaction was assessed. We co-cultured PBMC or monocytes from individual SS patients or control subjects with epithelial cells from a human salivary gland (HSG line). First, we characterized VIP/VPAC system in monocytes and phagocytosis of HSG

apoptotic epithelial cells. An increased expression of VPAC2 and reduced phagocytosis of apoptotic cells was found only in SS monocytes. These monocytes also failed to express an anti-inflammatory response upon phagocytosis of apoptotic cells. The functional and phenotypic profile of both epithelial cell and monocytes upon interaction was then studied. Our results indicate that the interaction can modulate both epithelial cells and monocytes contributing to the generation of a pro-inflammatory microenvironment where VIP could only partially modulate these signals.

**Key words:** Sjögren syndrome – gland homeostasis – vasoactive intestinal peptide-regulatory macrophages – phagocytosis – glandular epithelial cells

# **INTRODUCCIÓN**

## Capítulo 1

### Síndrome de Sjögren

#### 1.1. Características clínicas del Síndrome de Sjögren

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta entre el 0.3-1% de la población adulta, mayormente a mujeres en una relación 9:1. En los Estados Unidos de Norteamérica se estima que entre 2 y 4 millones de personas tienen SS, de los cuales solamente un millón tienen un diagnóstico establecido. Estudios recientes usando el criterio consensuado de clasificación de 2002 (*American European Consensus Criteria*, [1]) estimaron una prevalencia del 0,01-0,09% y una incidencia anual de 4,2 casos/100.000 norteamericanos [2].

Es la segunda enfermedad autoinmune más común luego de la Artritis Reumatoidea (AR) y con un impacto económico similar a la AR en los sistemas de salud [3]. Este impacto desfavorable se describe en países de Europa y América con consecuencias desfavorables en el empleo y en las tasas de compensación por discapacidad.

Se caracteriza principalmente por una pérdida progresiva de la función secretoria salival (xerostomía) y lagrimal (*keratoconjuntivitis sicca*), sin embargo, durante el curso de la enfermedad pueden aparecer manifestaciones extraglandulares que comprometen a diversos órganos y superficies mucosas dependiendo del entorno genético, hormonal y ambiental [4]. Entre las manifestaciones extraglandulares más frecuentes se encuentra una fatiga inhabilitante, artralgias, vasculitis, desórdenes hematológicos, falla renal, neuropatías centrales y periféricas, entre otras.

Sobre la base de estas observaciones el SS se considera una enfermedad autoinmune heterogénea que puede ser caracterizada con dos fenotipos I y II según sus características clínicas: En la forma I de SSp, las manifestaciones clínicas son benignas pero inhabilitantes para el paciente, como la sequedad de mucosas, el dolor y la fatiga. En la forma II las manifestaciones sistémicas son potencialmente severas, estos casos constituyen el 20-40% de los pacientes. Entre las consecuencias más serias del SS, cerca de un 5 % de los pacientes pueden desarrollar un linfoma B No-Hodgkin de grado bajo o intermedio que se origina en el tejido linfoideo asociado a la mucosa.



La enfermedad se presenta como desorden primario (SSp) o secundario a AR o Lupus Eritematoso Sistémico (LES), entre otras enfermedades autoinmunes. En pacientes diagnosticadas en forma temprana, pero en particular en aquellas diagnosticadas luego de años de desarrollo de la sintomatología *sicca*, el deterioro de tejidos oculares y del epitelio orofaríngeo por el déficit funcional del parénquima secretorio compromete la calidad de vida al interferir con funciones básicas cotidianas como hablar, comer y dormir. Aunque menos frecuente, la afectación del epitelio del tracto respiratorio alto y bajo produce lesiones que pueden resultar en tos crónica [5]

Dado que, como en otras enfermedades autoinmunes reumáticas, la etiología y patogenia son en parte desconocidas, hay escasos signos y síntomas que se pueden utilizar para diagnosticar el SSp certera y tempranamente. Por esta razón la mayoría de los pacientes son diagnosticados varios años después del comienzo de los síntomas de sequedad. Los criterios de diagnóstico se actualizan permanentemente para mejorar las herramientas de detección y diagnóstico, como también para facilitar y contribuir al desarrollo de fármacos. En la actualidad los criterios más comúnmente utilizados son los criterios del Consenso Americano Europeo [1]. Éste fue revisado y aprobado en 2012 [6] y recientemente se validaron dos índices para su diagnóstico llamados ESSDAI y ESSPRI (por *EULAR SS Disease Activity Index* o *EULAR SS Patients Reported Index*) en un estudio clínico conducido en el marco de la asociación EULAR (*European League Against Rheumatism*) [7]. Así, los individuos pueden ser diagnosticados con síndrome de Sjögren primario según los siguientes criterios:

- |   |  |
|---|--|
| <p>1. Síntomas oculares (1 respuesta afirmativa)<br/>¿Ha tenido de forma diaria, persistente, molestias de sequedad ocular en los últimos 3 meses?<br/>¿Tiene una sensación de arenilla en los ojos?<br/>¿Utiliza lágrimas artificiales más de 3 veces al día?</p> <p>2. Síntomas orales (1 respuesta afirmativa)<br/>¿Tiene sensación de sequedad oral en los últimos 3 meses?<br/>¿Ha tenido hinchadas las glándulas salivales de forma recurrente o persistente?<br/>¿Tiene que beber líquidos frecuentemente para poder tragar alimentos secos?</p> | <p>3. Signos oculares (1 resultado positivo)<br/>Test de Schirmer sin anestesia &lt; 5 mm en 5 min<br/>Tinción de Rosa de Bengala</p> <p>4. Biopsia de glándula salival menor: sialoadenitis linfocítica con focus score <math>\geq 1</math> (un foco de linfocitos es un acúmulo de más de 50 linfocitos por 4 mm<sup>2</sup> de tejido glandular)</p> <p>5. Alteración objetiva de la función de las glándulas salivales<br/>Sialometría: flujo sin estimulación <math>\leq 1,5</math> ml en 15 min<br/>Sialografía parotídea: sialectasias difusas<br/>Gammagrafía parotídea: captación retrasada, concentración reducida o excreción retrasada del marcador</p> <p>6. Autoanticuerpos: presencia en suero de anti-Ro/SSA o anti-La/SSB</p> |
|---|--|

**Figura A. Criterios americano-europeos de clasificación del síndrome de Sjögren (2002).** Tomado de Actualización de Síndrome de Sjögren. Enrique Calvo Aranda y Santiago Muñoz Fernández (2011).

Para que el paciente sea diagnosticado con SSp debe reunir 4 de los 6 criterios donde el criterio 4 o el 6 deben estar incluidos, o 3 de los criterios 3, 4, 5 y 6.

Recientemente Delaleu y colaboradores han propuesto a largo plazo la utilización de estudios proteómicos en saliva que incluyen 187 biomarcadores como una herramienta para el diagnóstico de la enfermedad [8], sin embargo existen aún interrogantes sobre la aplicación de dicha herramienta para la clasificación de pacientes, por un lado por el alto costo, y por otro debido a las dificultades técnicas para su validación [9], lo que requiere grandes cohortes de pacientes en estudios multicéntricos.

A pesar de los numerosos aportes efectuados y de las investigaciones presentes todavía no se ha encontrado un tratamiento curativo. Actualmente el tratamiento es sintomático que incluye medidas de manejo no farmacológicas y terapia local con análogos de saliva, o terapia farmacológica con agonistas de receptores muscarínicos como la pilocarpina o cevimelina, intentando aliviar la resequedad generada por la disfunción exocrina. Asimismo, la terapia farmacológica dirigida a aliviar los síntomas sistémicos y las manifestaciones extraglandulares de la enfermedad incluyen la prescripción de antiinflamatorios no esteroides, glucocorticoides y antipalúdicos como la hidroxicloroquina, mientras que están actualmente en estudio diversos fármacos del grupo de los biológicos [10, 11]. Los resultados con terapias biológicas en pacientes con SSp no han demostrado al presente una mejora sustantiva de los síntomas que justifique su indicación: En estudios clínicos que han completado la fase II con anticuerpos monoclonales como el belimumab, anticuerpo monoclonal que inhibe el factor de activación de células B (BAFF), se observó que el tratamiento de pacientes con 10mg/kg de belimumab en las semanas 0, 2 y 4 y luego cada 4 semanas hasta los 6 meses producen una modesta disminución en la sequedad y fatiga aunque no modifica el dolor [12]. Las pruebas de flujo salival y de Schirmer tampoco se modificaron por el tratamiento. En el caso del rituximab, anticuerpo monoclonal quimérico contra CD20, se observó que la administración de 1 g de rituximab durante 2 semanas solo alivia algunos síntomas a corto plazo, sin embargo luego de 6 meses no hay mejoras [13] y se discute que el tratamiento con un único biológico solo genera beneficios clínicos

modestos comparado con los tratamientos estándar [14].

### **1.2. Mecanismos etiopatogénicos del Síndrome de Sjögren primario**

Los mecanismos etiopatogénicos responsables del SSp no han sido totalmente dilucidados. Se han descrito algunos posibles desencadenantes tanto ambientales como hormonales, los cuales, en sujetos genéticamente susceptibles, darían lugar a una respuesta autoinmune.

Entre los desencadenantes hormonales se considera la falta de estrógenos y DHEA (prohormona precursora de andrógenos y estrógenos) como posible factor que predispone al desarrollo de la enfermedad. Esto explicaría la dominancia femenina como también la prevalencia en etapas peri-menopáusicas [15]. Los estrógenos en condiciones normales tendrían un rol anti-apoptótico en el epitelio acinar secretor [16, 17]. En estudios con cepas de ratones normales, la remoción de sus ovarios (principal fuente de estrógenos en ratones) promueve la apoptosis selectiva de células secretorias en glándulas submaxilares. Estos ratones desarrollan subsecuentemente una condición similar al SS con producción de autoanticuerpos [18]. Por otro lado, ratones *Knock-Out* para la aromatasa, enzima que cataliza la producción de estrógenos, desarrollan una exocrinopatía autoinmune, con destrucción de células acinares en glándulas submaxilares y producción de autoanticuerpos contra  $\alpha$ -fodrina [19]. Estos resultados sostienen la hipótesis que la deficiencia en estrógenos podría favorecer la exocrinopatía autoinmune.

La predisposición genética también tiene un papel en la patogenia ya que confiere susceptibilidad a la enfermedad. Por un lado alelos en la región del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, principalmente HLA-DR y HLA-DQ están involucrados en la patogenia del SS: Existe una alta prevalencia de los genes de HLA-B8, HLA-Dw3 y HLA-DR3 o HLA-DR2 y HLA-DR5 en pacientes dependiendo de su origen étnico [20, 21]. Sin embargo, la presencia de dichos alelos se vio asociada en mayor medida a la presencia de autoanticuerpos específicos que al desarrollo de la enfermedad en sí. Por otro lado, estudios moleculares han demostrado que los pacientes con SS poseen el

alelo DQA1\*0501 sin importar diferencias raciales ni étnicas, lo que sugiere que dicho alelo podría ser un factor determinante en la predisposición a la enfermedad [22]. También se ha encontrado asociación de polimorfismos en alelos que influyen en la respuesta de interferón de tipo I. En distintas cohortes de pacientes se ha demostrado una asociación de los polimorfismos en los alelos IRF5 rs2004640 T, IRF5 (CGGGG indel, SNP rs10488631) y STAT4 (SNPrs7582694) con el desarrollo del SS [23]. Una susceptibilidad genética que favoreciera una respuesta exacerbada del interferón de tipo I a distintos estímulos podría ser un evento clave en el desarrollo o la perpetuación de la enfermedad.

Por otro lado existen diversos factores ambientales, particularmente agentes virales, que podrían tener un rol en la patogenia de la enfermedad. Dichos agentes podrían estar actuando como activadores intrínsecos del epitelio glandular favoreciendo una respuesta inflamatoria prolongada en individuos genéticamente predispuestos, resultando en autoinmunidad sistémica. Se describieron diversos agentes exógenos que pueden activar la reacción autoinmune en los pacientes con SS tales como virus herpes: Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus linfotrópico humano tipo 1 (VLTH1), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), coxackievirus. Sin embargo hasta el momento la asociación entre el SS y las infecciones virales no está del todo dilucidada [24-26].

### **1.2.1. Papel de las células epiteliales glandulares en la patogénesis del SS**

En la última década se han desarrollado abordajes y modelos más propicios para comprender los mecanismos patogénicos, basados en una observación que resultó central durante el curso de esta enfermedad: La moderada infiltración de células mononucleares que infiltran las glándulas no correlaciona con la severidad de la disfunción secretoria [16, 27, 28]. Contrariamente a lo que ocurre en otras enfermedades autoinmunes como la diabetes de tipo 1, o en la falla renal, donde los síntomas aparecen cuando más del 90% de las células parenquimales se encuentran irreversiblemente destruidas, en el síndrome de Sjögren primario alrededor del 50% de la glándula se encuentra funcional al momento del diagnóstico [5]. Basados en este dato clínico, se ha propuesto que eventos tempranos que contribuyen a la alteración y

pérdida de la homeostasis en las glándulas con un rol activo pro-inflamatorio del epitelio (defectos en la señalización intracelular de células epiteliales, aumento de apoptosis de acinos o activación aberrante del epitelio secretor), podrían aumentar la susceptibilidad del tejido a una respuesta autoinmune que a su vez empeora la función salival. Así, el epitelio glandular 'activado' estaría actuando como facilitador en el desarrollo y perpetuación de la respuesta pro-inflamatoria y autoinmune [27, 29-31]. En estudios tanto de biopsias de glándula labial de pacientes con SS como en cultivos primarios de células epiteliales derivados de biopsias de glándula salival de pacientes se ha reportado un aumento en los niveles de expresión de receptores de tipo Toll y se sugirió su capacidad de gatillar una respuesta inmune innata luego del reconocimiento por ligandos del tipo PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) o DAMP (patrones moleculares asociados al daño). Entre los más destacados se encuentra el receptor TLR3 que reconoce RNA de doble cadena mediando la respuesta contra infecciones virales [28]. En un modelo murino de SS el tratamiento con poly(I:C) (análogo sintético de ARN de doble cadena) induce una rápida pérdida de la función salival asociada a un incremento de mediadores pro-inflamatorios en las glándulas salivales [32]. Por otro lado, estudios de *microarrays* utilizando tejido de glándula salival de otro modelo murino de SS apoyan el rol de la señalización vía TLR3 en la activación del epitelio ya que se observó un aumento de *Irf3* y *Traf6*, genes involucrados en dicha vía [33]

El incremento de apoptosis de acinos ha sido reportado por varios grupos tanto en biopsias de glándulas salivales labiales [34, 35], como en líneas celulares derivadas de pacientes y en glándulas de distintos modelos murinos [36]. Además se reportó que cuerpos apoptóticos o exosomas provenientes de células epiteliales de glándulas salivales de pacientes con SS contienen proteínas, especialmente CMH de clase I y II, moléculas co-estimuladoras y autoantígenos SS-A/SS-B, que pueden activar al sistema inmune innato, específicamente a células dendríticas induciendo la producción de mediadores pro-inflamatorios que podrían llevar consecuentemente a la inflamación y apoptosis en la glándula [37].

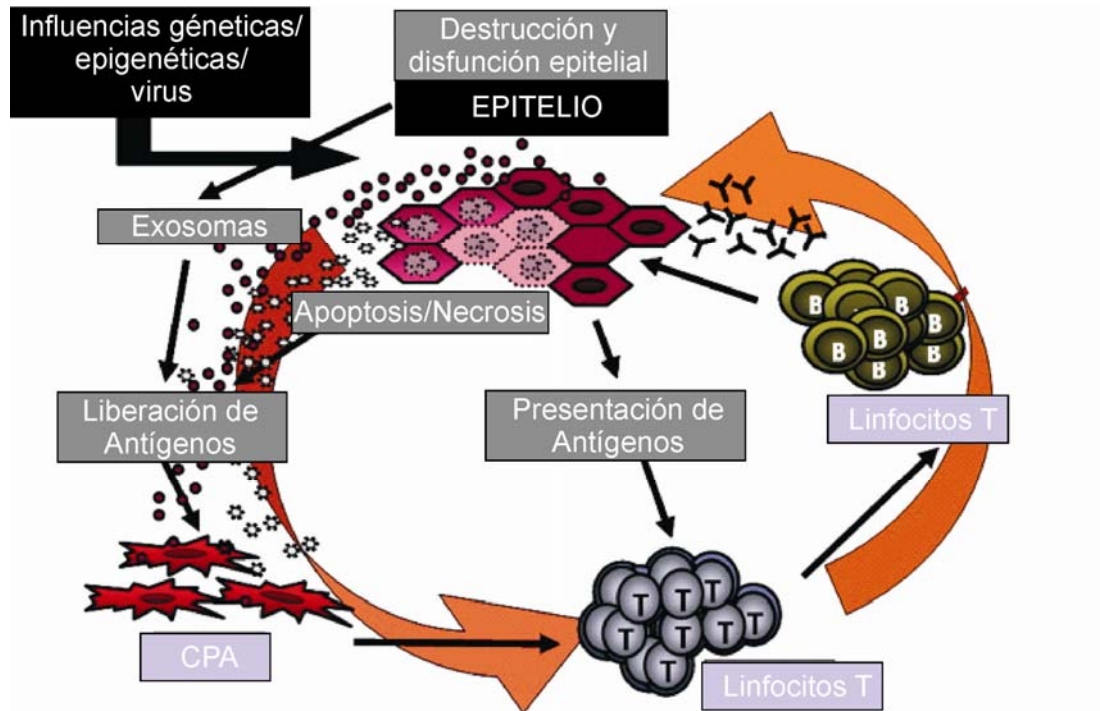
Por otro lado, trabajando con biopsias de glándulas labiales de pacientes con SS,

Barrera y colaboradores reportaron la pérdida de anclaje de células acinares de la lámina basal. Esta pérdida se debería en parte a una mayor síntesis y actividad de metaloproteasas, especialmente MMP-3 and 9 que degradan los componentes de la lámina basal. Además se observaron cambios en la expresión de laminina y colágeno IV en la lamina basal de acinos y ductos, característicos de una estructura desorganizada [38]. Este estado de desorganización de la lámina basal permitiría la invasión linfocitaria contribuyendo a la muerte celular y la hiperplasia ductal. Asimismo, se ha reportado que la laminina puede activar a TLR4 contribuyendo de esta manera a la iniciación de la enfermedad [39].

Distintos autores proponen que existe una redistribución de los canales de agua, especialmente la acuaporina 5 (AQP5), que tendría un rol en la patogenia de la enfermedad. En biopsias de glándulas labiales de pacientes con SSp se encontró incrementada la expresión del canal en la membrana basolateral, lo que alteraría el transporte transcelular de agua [40]. Esta misma localización basolateral se observó en glándulas salivales de ratones NOD, uno de los modelos experimentales de SS [41]. Consistente con esto, estudios recientes en distintos modelos murinos de SS, incluido el modelo NOD, aportan evidencias sobre la relocalización de AQP5 que correlaciona con el grado de inflamación de las glándulas [42]. Por otro lado hay estudios que indican que existe un incremento en la concentración de AQP5 presente en las lágrimas de pacientes con SS, lo que sugiere que la proteína sería liberada hacia las lágrimas cuando las células acinares están afectadas [43]

Todas estas observaciones sostienen la necesidad de conocer los mecanismos que llevan a la disfunción epitelial en etapas tempranas para lograr mejorar el diagnóstico y la terapéutica. Así, se ha propuesto un abordaje integrado de los mecanismos patogénicos del SSp enfocando la confluencia de señales nerviosas, endocrinas y de mediadores locales sintetizados por células inmunes y epiteliales secretorias, esenciales en el mantenimiento de la homeostasis glandular. La propuesta sostiene que más de un mecanismo homeostático está afectado en el inicio del SS y que, *a posteriori* de la falla funcional de la glándula, ocurren alteraciones patológicas que influyen en el arribo y retención de células mononucleares, manteniendo un perfil

predominantemente pro-inflamatorio no regulado y generando una pérdida de la tolerancia inmunológica que conlleva a una respuesta autoinmune [28]. Dicha respuesta no explicaría el daño funcional al inicio de la enfermedad, pero contribuiría a su perpetuación y profundizaría la disfunción secretoria (Figura B).



**Figura B. Modelo de patogénesis del síndrome de Sjögren.** Se propone la participación del epitelio glandular en la perpetuación de la respuesta inflamatoria y pérdida de tolerancia inmunológica. Modificado de [28].

### 1.3. Modelos murinos de exocrinopatía autoinmune

Como se ha señalado antes, los factores que favorecen el desencadenamiento del SSp son desconocidos, los eventos tempranos son difíciles de detectar en humanos y los síntomas clínicos suelen ser diagnosticados tardíamente. En este sentido, los modelos murinos resultan herramientas útiles para explorar causas multifactoriales previas a la aparición de los signos de disfunción secretoria, como pueden ser componentes inmunopatológicos y/o vías de señalización específicas incorrectamente activadas en las células blanco, eventos que facilitarían el posterior ataque autoinmune [44]. Se

han descrito varios modelos murinos, cada uno exhibe características específicas y modela distintos signos o aspectos de la enfermedad en humanos, permitiendo explorar individualmente esos aspectos, desde las causas que conducen al inicio de la lesión glandular como también aquellas responsables del inicio y la perpetuación de la respuesta autoinmune. Entre los modelos con mayor o menor validez por su semejanza con la enfermedad humana se destacan los ratones MRL/lpr, la cepa de ratones *SjS-prone* C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 y los ratones diabético no obesos (NOD).

La cepa MRL-lpr/lpr es un modelo que desarrolla espontáneamente características similares a diversas enfermedades autoinmunes como LES, AR y SS. Se ha demostrado que dicho fenotipo se debe a una mutación genética del gen de linfoproliferación (lpr) en el cromosoma 19 que codifica para el antígeno Fas. El fenotipo similar al SS comienza a las 8 semanas de edad con la aparición de infiltrados linfocitarios en las glándulas submaxilares, seguido de una inflamación severa en las glándulas parótidas y sublinguales. Sin embargo esta cepa no sintetiza autoanticuerpos ni presenta signos de disfunción secretoria [45].

Los ratones *SjS-prone* C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 son ratones con un *background* C57/B6 que poseen 2 regiones genéticas derivadas de ratones NOD (locus *Idd3* y *Idd5*), que transfieren totalmente el fenotipo del síndrome de Sjögren detectado en la cepa NOD. Además de presentar infiltrados linfocitarios en las glándulas exocrinas acompañado con producción de autoanticuerpos (SSA/Ro, SSB/La) y anti receptor muscarínico M3, estos ratones presentan incrementada la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-12, IL-22 e IL-23 tanto local como sistémicamente. Una ventaja de este modelo es su potencialidad para estudiar la contribución de genes individuales o *sets* de genes dentro de estos 2 loci [46].

Más recientemente se describieron modelos murinos transgénicos para diversas citoquinas que presentan características encontradas en el SS. Entre ellos se encuentran los ratones transgénicos para IL-12 [47], IL-10, IL-6 y los ratones transgénicos de BAFF [48]. Desarrollan una patología similar al SS que se manifiesta con una severa sialoadenitis, disminuida producción de saliva y destrucción de las glándulas salivales en todos los casos. Estos modelos son útiles para el estudio de las



distintas citoquinas en la patogénesis de la enfermedad [49].

### **1.3.1. Ratones diabéticos no obesos (NOD)**

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) en el estadio prediabético modelan procesos de mantenimiento y ruptura de la homeostasis tisular en las glándulas que pueden conducir a la pérdida de tolerancia y autoinmunidad.

Esta cepa surgió originalmente como una sub-línea de los ratones ICR. Se utilizó la progenie de una hembra que espontáneamente desarrolló diabetes mellitus dependiente de insulina y la crianza selectiva de esta progenie llevó en la sexta generación al establecimiento de la cepa NOD/Lt [50].

Dependiendo de las condiciones de cría, la cepa NOD desarrolla diabetes entre las semanas 20-30 de vida y, por eso, permite estudiar eventos tempranos que pueden afectar el equilibrio homeostático de las glándulas ya desde la etapa prenatal y luego postnatal a lo largo del estadio prediabético. A partir de las 12 semanas, y con mayor incidencia en las hembras, desarrollan una sialoadenitis espontánea a predominio Th1 contra las glándulas exocrinas que se caracteriza por alteraciones histológicas y funcionales que resultan en una disminución de la función secretoria, semejante en algunos aspectos a la enfermedad en humanos. Se han detectado autoanticuerpos anti-SSA/Ro, anti-SSB/La y anti-receptor muscarínico M3, los cuales se ha demostrado que contribuyen a la disfunción secretoria [45, 51].

Asimismo, evidencias obtenidas en el modelo NOD sugieren la existencia de anomalías genéticamente programadas que están asociadas a alteraciones funcionales en el sistema inmune y/o en el órgano blanco que favorecen el desarrollo de la sialoadenitis. En primer lugar en las glándulas salivales de los ratones NOD hay una acumulación de células presentadoras de antígenos previo a la infiltración linfocitaria de la glándula. Estas células especializadas pueden activar linfocitos T *naive* estimulando la iniciación de la sialoadenitis [45]. Esto no ocurre en otros modelos murinos de SS o en las cepas control. En segundo lugar, el análisis bioquímico de muestras de saliva de ratones NOD-*scid* revela una composición proteica distinta respecto a la cepa control [52]. Entre las proteínas diferentes que se encontraron se

describe una isoforma truncada de la proteína secretoria de parótida (PSP) en la saliva de ratones NOD-*scid* adultos. Esta proteína además se expresa ectópicamente en las glándulas submaxilares (SMG) de dichos ratones [52]. En tercer lugar, se encontró un incremento en la actividad cisteína-proteasa y una elevada expresión de metaloproteasas tanto en glándulas salivales de los ratones NOD como de los NOD-*scid*. [53] En cuarto lugar, estudios en glándulas salivales de ratones NOD neonatales han demostrado que desde el día 1 postparto las glándulas presentan una diferenciación morfológica retrasada, que se normaliza a los 8 días de edad [54]. Asimismo, presentan disminución en la proliferación celular y un incremento en la expresión de Fas, Fas-L y Bcl-2. Los niveles elevados de moléculas que regulan la apoptosis pueden reflejar alteraciones en el crecimiento normal y diferenciación del epitelio secretor. Estos datos en conjunto muestran que los ratones NOD presentan signos de alteración en la estructura y homeostasis glandular en el periodo neonatal similares a los que se ven luego en la etapa adulta y que preceden al desarrollo de la exocrinopatía autoinmune [54].

Cabe destacar que estas observaciones ponen de manifiesto la relevancia de identificar en los modelos murinos, ya desde la etapa embrionaria, eventos moleculares clave en el desarrollo de las glándulas salivales: En particular, determinar si tales eventos están desregulados y si las alteraciones podrían subyacer a la pérdida de la homeostasis glandular y posterior inicio de la exocrinopatía autoinmune.

Finalmente, se ha propuesto que la exocrinopatía autoinmune en los ratones NOD se desarrolla en 2 fases: Una fase inicial independiente de la respuesta inmune, debida principalmente a consecuencias de alteraciones intrínsecas de la homeostasis glandular. La segunda fase involucra un ataque específico del tejido por células T activadas, células B y producción de autoanticuerpos. En esta etapa se produce el infiltrado linfocitario y el daño tisular. Sustentando esta propuesta, la cepa de ratones *SjS-prone* C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 presentan a las 8 semanas de edad, consistente con una etapa inicial, una alteración homeostática glandular que precede al desarrollo de la enfermedad [33]. En dichos estudios los autores no solo encontraron un incremento en el número de células epiteliales glandulares apoptóticas sino también un

incremento en la expresión de distintas caspasas inflamatorias como la caspasa 1 y 11. Estas caspasas son esenciales para promover un ambiente pro-inflamatorio previo al desarrollo de la enfermedad. Los mismos autores en un estudio previo utilizando *microarrays* encontraron una alterada expresión de receptores de la super-familia de TNF  $\alpha$  y de TLR3 sugiriendo una posible etiología viral [33, 55].

### **1.4. Aspectos fisiopatológicos y del desarrollo de las glándulas salivales en relación con el Síndrome de Sjögren**

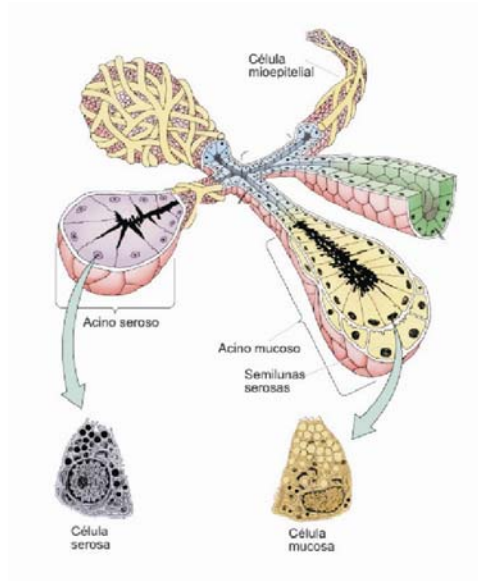
#### **1.4.1. Estructura de las glándulas salivales y regulación de la función**

Las glándulas pueden ser divididas en 2 grupos principales:

- Glándulas endocrinas: No contienen ductos y sus productos secretorios son liberados directamente al torrente sanguíneo o al sistema linfático.
- Glándulas exocrinas: Sus productos son secretados a través de un sistema de ductos que conectan la superficie epitelial interna y externa.

Las glándulas salivales se encuentran dentro del grupo de glándulas exocrinas. En humanos y ratones existen 3 tipos de glándulas salivales mayores: parótida, submaxilar y sublingual [56]. Estas secretan saliva a través de un sistema de conductos que transportan la secreción hacia la cavidad bucal. En este sistema, las células secretorias se encuentran dispuestas en acinos alrededor de las ramificaciones menores del sistema de ductos formando numerosas estructuras individuales que pueden considerarse unidades de secreción.

Los acinos son los encargados de la síntesis de los componentes de la saliva. Pueden estar formados exclusivamente por células serosas y mucosas. Las células serosas presentan una estructura piramidal con el núcleo localizado basalmente rodeado de citoplasma y los gránulos secretorios se encuentran en los ápices (Figura C).



**Figura C. Estructura de las glándulas salivales.** Modificado de[56].

Las células serosas secretan principalmente sales, enzimas y proteínas glicosiladas mínimamente o no glicosiladas. Las células mucosas almacenan glucosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas en sus gránulos secretorios que son hidratados al ser liberados formando el *mucus*. Las glándulas parótidas poseen principalmente células secretoras serosas. Su secreción es acuosa, poco densa, rica en enzimas y diversas proteínas. Las glándulas submaxilares y sublinguales, por su lado, son mixtas y contienen ambos tipos celulares aunque en distinta proporción. En las sublinguales se encuentran acinos fundamentalmente mucosos [56].

La secreción de los fluidos y proteínas salivales está controlada por el sistema nervioso autónomo [57, 58]. Todas las glándulas salivales están innervadas por nervios colinérgicos parasimpáticos que liberan acetilcolina (ACh) que actúa principalmente uniéndose a los receptores muscarínicos M3 y en menor medida M1, provocando la secreción de saliva por las células acinares a la luz de los ductos. La mayoría de las glándulas salivales también están innervadas por el sistema nervioso simpático que libera noradrenalina que por activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, provocan la liberación de proteínas almacenadas principalmente por las células acinares pero en menor medida también por los ductos. Existen también neuropéptidos no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) liberados por los nervios autonómicos

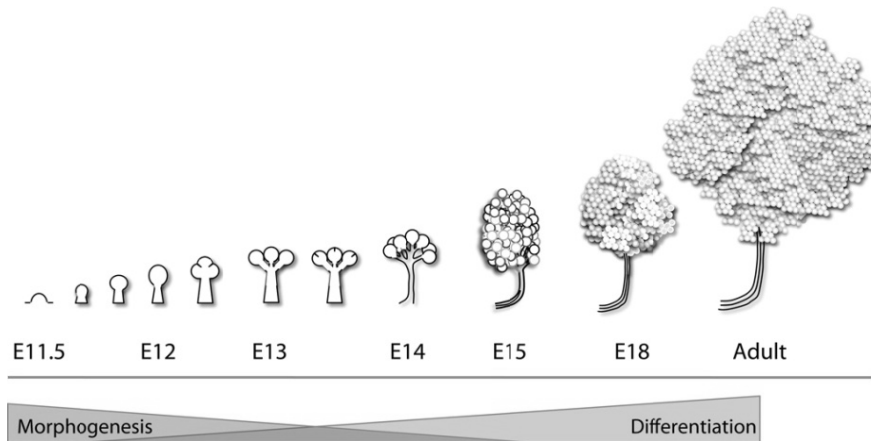
parasimpáticos y simpáticos que evocan la secreción salival como son el péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P, neuropeptido Y, entre otros [58]. El VIP es sintetizado por neuronas parasimpáticas y actúa a través de sus receptores potenciando los efectos de acetilcolina y es de los principales estímulos para la secreción proteica en las glándulas salivales [59].

La secreción y absorción de electrolitos por las células acinares por su parte requiere de la regulación coordinada de diversos transportadores iones y canales proteicos. La mayoría de estos canales y transportadores son activados o regulados positivamente por un incremento en la concentración intracelular de calcio [60].

La secreción de agua involucra diversas acuaporinas, principalmente la acuaporina 5. En ratones *knock out* para AQP5, a pesar de que el contenido proteico y la actividad de amilasa no se ven afectadas, hay una reducción del 60% de la tasa de secreción estimulada por el agonista muscarínico pilocarpina respecto a ratones controles. Este canal se encuentra localizado principalmente sobre la membrana apical de los acinos en glándulas normales [61] mientras que en pacientes con SSp se describió una localización basal o basolateral y no apical en los acinos, como se mencionó antes [40]. Esta distribución anormal del canal AQP5 podría contribuir a la deficiente secreción que presentan dichos pacientes.

### **1.4.2. Desarrollo embrionario de la glándula salival**

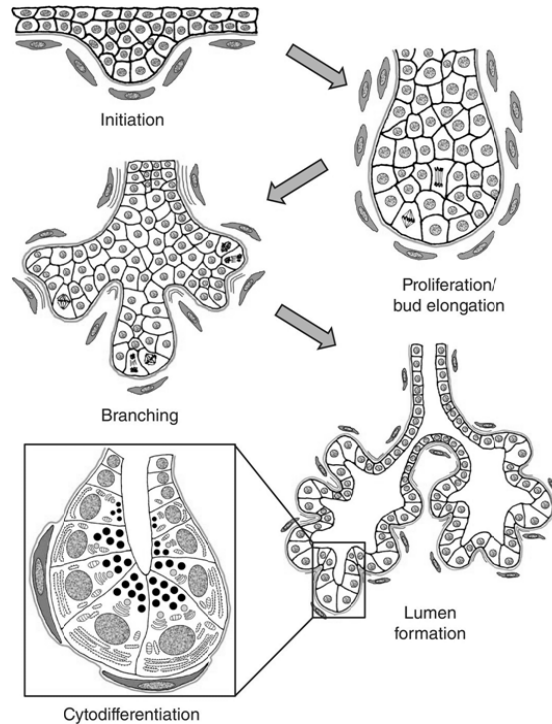
El desarrollo embrionario de los órganos secretorios incluyendo riñones, pulmones, glándula mamaria, próstata y glándula salival dependen de un proceso conocido como morfogénesis de ramificación o *branching morphogenesis* [62]. Este proceso le permite maximizar el área de superficie total minimizando el volumen total del tejido. En especial, en la glándula salival de los vertebrados es crucial en la generación de grandes superficies requeridas para la producción de saliva. Paralelamente a la morfogénesis ocurre la diferenciación celular [63] (Figura D). Ambos procesos son parcialmente independientes ya que la glándula sigue su maduración luego del nacimiento adquiriendo la capacidad de expresar y sintetizar productos génicos salivales específicos.



**Figura D. Desarrollo de la glándula salival.** La morfogénesis de la glándula salival comienza al día E11.5. Mientras que el proceso de morfogénesis se atenúa a lo largo del tiempo, la diferenciación celular se incrementa. Ambos procesos son importantes en la formación del complejo celular que compone a la glándula adulta. Tomado de [63].

Estos procesos dependen de la expresión de moléculas de matriz extracelular como de la interacción recíproca con el sistema nervioso y endotelial que direccionan la morfogénesis y citodiferenciación del epitelio regulando la proliferación y apoptosis. Estos eventos están altamente regulados y coordinados tanto temporal como espacialmente [64].

En ratones el desarrollo de la glándula salival empieza al día embrionario 11,5 (E11,5) donde hay un engrosamiento del epitelio oral primitivo y alrededor del día E12 (E12) un brote (*bud*) epitelial inicial emerge en la punta de un tallo y crece en el mesénquima condensado derivado de la cresta neural. Al día E13 las hendiduras en el epitelio resultan en 4-5 brotes. El proceso de morfogénesis de ramificación prosigue con proliferación, distintas rondas de formación de hendidura y elongación del ducto, logrando una glándula multilobulada al día E14 [64].



**Figura E. Desarrollo de la glándula salival.** El desarrollo se inicia con la proliferación del epitelio que lleva a la formación de un brote que crece rodeado de tejido mesenquimal. Hay una interacción recíproca entre tejido epitelial y mesenquimal que involucra factores de crecimiento, receptores y factores de transcripción que regulan este proceso. La proliferación de dichas células conjuntamente con la ramificación del cordón epitelial resultan en brotes terminales conectados por ductos cuyo lumen se forma adecuadamente. Los ductos y los brotes terminales comienzan simultáneamente a diferenciarse para convertirse en células secretorias.

La diferenciación funcional, con la aparición de células procinases y productos secretorios comienza al día E15 y continúa luego del nacimiento hasta la pubertad. De esta manera la glándula salival que se caracterizaba por ser “un brote, un ducto” sigue creciendo y desarrollándose significativamente y el ducto comienza a luminizarse [64] (Figura E). Alrededor del lumen en formación las células epiteliales proliferan activamente mientras que las células centrales del futuro lumen entran en apoptosis. Recientemente se ha demostrado que el sistema parasimpático regula la tubulogénesis. A través de la liberación del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y activando la vía de señalización AMPc/PKA, el ganglio que innerva la glándula promueve el crecimiento ductal que lleva a la formación de un ducto continuo [65].

Por otro lado, los brotes terminales se reorganizan y comienzan a formar acinos (Figura E). Al día E15-E16 la formación del lumen en el ducto secretorio principal está casi completa mientras que al día E17 se completa la formación de lumen en el acino generando una glándula que tiene una red continua formada por ductos luminizados conectados a los acinos en la cavidad oral. La diferenciación celular ocurre en paralelo a la morfogénesis de ramificación por vías que son parcialmente independientes. Al presente no se dispone de información acerca de la contribución de células inmunes en estos estadios tempranos del desarrollo de las glándulas [64].



## Capítulo 2

### **Mantenimiento y ruptura de la homeostasis tisular**

El mantenimiento de la homeostasis tisular asegura un adecuado equilibrio funcional y estructural de los diferentes órganos. Numerosos procesos participan en el control de la homeostasis tisular y son responsables de la reparación de estructuras y recuperación de circuitos fisiológicos dañados por el funcionamiento normal de los tejidos o por injurias diversas.

La pérdida del control homeostático de los tejidos se asocia con deficiencias en la función y alteraciones estructurales que en muchos casos pueden desencadenar respuestas inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunes [66, 67]. Los procesos que participan en el control de la homeostasis tisular incluyen el crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y remoción de cuerpos apoptóticos por fagocitos profesionales en un microambiente inmunosupresor, la reparación tisular, entre otros. El crecimiento de nuevas células por activación del ciclo celular de su progenitor, seguida de su diferenciación ocurre conjuntamente con la muerte de células dañadas o redundantes [68]. Por lo tanto la apoptosis es un proceso esencial durante el normal desarrollo de los tejidos en condiciones de homeostasis tisular y en procesos patogénicos. Estos procesos están finamente sincronizados lo que logra que, a pesar del constante recambio de células por muerte celular programada, en condiciones fisiológicas no se encuentren células apoptóticas aun en tejidos con alta tasa de apoptosis como es el timo donde eventualmente el 80% de los timocitos entran en apoptosis [69].

#### **2.1 Homeostasis tisular: Apoptosis y remoción de cuerpos apoptóticos**

Como ya se mencionó, la apoptosis es un proceso finamente regulado y fundamental para la eliminación de células dañadas o redundantes. Para iniciar la apoptosis existen 2 vías principales de activación: la intrínseca y la extrínseca. La primera, también llamada vía mitocondrial, es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes

o daño genotóxico. En cambio la vía extrínseca o de receptores de muerte es activada por la unión de diferentes estímulos externos como TNF- $\alpha$  y Fas. La activación de ambas vías resulta en la iniciación de múltiples cascadas de señalización, que terminan en la activación de distintas caspasas, principales efectores de la apoptosis.

Una característica de la apoptosis es la generación de cuerpos apoptóticos por la microvesiculación de la membrana que deben ser rápidamente eliminados, principalmente por macrófagos, para evitar la liberación de componentes celulares potencialmente citotóxicos, inmunogénicos e inflamatorios [69]. Para lograr ser reconocidas por fagocitos, las células apoptóticas emiten señales celulares solubles o a través de micropartículas derivadas de la membrana plasmática estableciendo un gradiente quimiotáctico que estimula el direccionamiento del fagocito hacia el sitio afectado [69]. Entre los principales mediadores se encuentran nucleótidos como ATP y UTP [70]; microvesículas liberadas por células B de los centro germinales que incluyen ICAM3 [71] y CX3CL1 [72] y promueven la quimiotaxis de macrófagos; lisofosfatidilcolina (LPC) generada por hidrólisis de fosfatidilcolina que induce la migración de macrófagos *in vivo* e *in vitro* [73] e induce la expresión de las quimioquinas MCP-1 y RANTES en células endoteliales vasculares potenciando el reclutamiento de monocitos. Además de emitir señales de atracción para las células mononucleares, las células apoptóticas contribuyen a la resolución de la inflamación secretando lactoferrina, la cual inhibe potentemente la migración de neutrófilos [74]. Por otro lado durante la apoptosis las células sufren cambios en la membrana plasmática que le permite a los fagocitos distinguir entre células vivas y apoptóticas. Entre los cambios se destacan el incremento en la exposición en superficie de fosfatidilserina y calreticulina [69]. Luego de la interacción de las señales de reconocimiento con los receptores específicos, el citoesqueleto del fagocito sufre un re-arreglo necesario para la internalización del cuerpo apoptótico. Para esto los receptores de reconocimiento deben estar asociados a los distintos componentes del citoesqueleto.

Un aspecto fundamental del proceso es la forma inmunológicamente 'silenciosa' de la eliminación de los cuerpos apoptóticos por fagocitos, principalmente macrófagos. La

ingestión de cuerpos apoptóticos provee un efecto inmunomodulador con la liberación de citoquinas anti-inflamatorias y la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias que conducen a la tolerancia inmunológica. La fagocitosis induce la secreción de citoquinas y moléculas anti-inflamatorias e inmunosupresoras, TGF- $\beta$ , PGE2 e IL-10 [75, 76]. Estas citoquinas por su lado inducen la diferenciación de células Treg inhibiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria [77]. Además las células apoptóticas reducen la secreción de citoquinas como IL-12, inhiben la expresión de NOS inducible y estimulan la expresión de arginasa-1 previniendo la producción de óxido nítrico [78, 79]. Es interesante destacar que no es necesaria la internalización de los cuerpos apoptóticos para modular la secreción de citoquinas. Estudios *in vitro* han demostrado que membranas de células apoptóticas son suficientes para inhibir la secreción de IL-12 en macrófagos inducida por LPS y estimular la secreción de TGF- $\beta$  [78, 80]. La producción de TGF- $\beta$  generada durante el proceso fagocítico induce además la expresión de PPAR $\gamma$  incrementando las propiedades anti-inflamatorias en los macrófagos [81].

### **2.2. Participación de los macrófagos en el mantenimiento de la homeostasis tisular**

Los macrófagos cumplen funciones ante la llegada de un agente inflamatorio y durante la injuria tisular y también actúan en procesos de remodelación tisular y remoción de cuerpos apoptóticos en ausencia de inflamación [82]. Dada su plasticidad funcional se propone su clasificación en fenotipos que conforman un espectro fenotípico y funcional determinado por las condiciones microambientales en las que son reclutados o activados [83, 84]. Dentro de este espectro existen poblaciones fenotípicamente diferenciables: una población de macrófagos activados en un perfil inflamatorio y poblaciones que expresan un perfil de activación alternativo que, a su vez, se pueden subdividir en macrófagos especializados en la inmunoregulación o regulatorios y otros que median la reparación tisular.

Los macrófagos inflamatorios son fundamentales durante la fase inicial de una inflamación aguda. Son estimulados principalmente por citoquinas pro-inflamatorias

como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o ligandos de los receptores de tipo Toll. Estas señales activan las vías de señalización de STAT1, NF $\kappa$ B, IRF5, entre otras, favoreciendo la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 y altos niveles de óxido nítrico (NO) a partir de arginina [85]. Estos macrófagos presentan baja capacidad fagocítica en parte debido a que IFN- $\gamma$  induce elevados niveles basales de F-actina y activación de Rac1 lo que no favorece el re-arreglo del citoesqueleto necesario durante el proceso fagocítico [86].

Los macrófagos asociados a una función reparadora tisular tienen como principal estímulo a las citoquinas IL-4/IL-13 que inducen la expresión del receptor de manosa CD206, arginasa 1 y la secreción de TGF- $\beta$ . Por la inducción de la enzima arginasa 1, éstos derivan la arginina a la producción de ornitina y poliaminas que favorecerán la producción de matriz extracelular y reparación [87]. Por otro lado, el TGF- $\beta$  activa la producción de colágeno, componente de la matriz extracelular [88]. Adicionalmente estos macrófagos son capaces de sintetizar directamente ciertos componentes de la matriz celular como colágeno tipo VI y fibronectina [89]. La importancia relativa de los macrófagos reparadores tisulares y otros tipos celulares, principalmente fibroblastos, en la síntesis y producción de componentes de la matriz celular durante la reparación tisular aún no ha sido aclarada completamente [87]. Como factores de transcripción importantes para la inducción y activación de este perfil se han descrito las vías de PPAR $\gamma$ , KLF4 y STAT6 [90]. Todos estos marcadores poblacionales fueron determinados *in vitro*. Al estudiar la existencia de esta población *in vivo* se observó la presencia de macrófagos con un perfil como el anteriormente descrito pero que adicionalmente producen citoquinas pro-inflamatorias en etapas tempranas del proceso de reparación, mientras que las poblaciones presentes en etapas tardías incrementan aún más la expresión de los marcadores específicos como el CD206, en ausencia de los activadores canónicos IL-4/IL-13. Por lo tanto, durante la reparación tisular los macrófagos pueden exhibir fenotipos complejos y heterogéneos que varían a lo largo del proceso y no se corresponden completamente con la categoría descrita *in vitro* [87].

La otra población bien caracterizada es la inmunoreguladora. Ésta es inducida en respuesta a distintos estímulos como complejos inmunes, cuerpos apoptóticos,

glucocorticoides e IL-10 que a través de su receptor activa la vía de señalización de STAT3 [91]. Se caracterizan por tener una alta capacidad fagocítica, especialmente de células apoptóticas. Esta función requiere específicamente de la inducción de MerTK [92]. Son grandes productores de las citoquinas IL-10, TGF- $\beta$  y PGE2 y bajos de IL-12 promoviendo la tolerancia inmunológica. Estos macrófagos se asocian a las etapas de resolución de la inflamación.

La plasticidad funcional de los macrófagos les permite además re-direccionar su perfil funcional ante cambios en su microentorno. Por esta razón se ha propuesto que los macrófagos juegan un rol importante en la progresión de diversas patologías como cáncer [93], diabetes, obesidad [94, 95] y síndrome metabólico [96].

Actualmente se discute si los monocitos (Mo) circulantes ya se encuentran diferenciados en estos perfiles al ser reclutados en tejidos, con diferencias entre ratón y humanos en la abundancia relativa de distintos fenotipos. Los monocitos humanos pueden ser clasificados por los niveles de expresión de CD14 y CD16 en 3 sub-poblaciones: Los monocitos CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> que en una persona sana conforman entre el 90-95% de los monocitos totales; una población CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup> que es la mayor productora de IL-10; y los monocitos denominados pro-inflamatorios o no clásicos que se caracterizan por ser una sub-población CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>hi</sup>. Esta sub-población se la denomina pro-inflamatoria ya que frente a agonistas de TLR produce menores niveles de IL-10 y mayores niveles de TNF- $\alpha$ . La diferenciación de los monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>hi</sup> a macrófagos con M-CSF presentan disminuida la expresión de CD163 e incrementada la fagocitosis de bacterias [97]. Esto evidencia que la diferenciación de las distintas poblaciones monocíticas puede dar lugar a fenotipos diferentes de macrófagos.

### **2.3. Ruptura de la homeostasis: Inflamación crónica y autoinmunidad**

La desregulación de los procesos inflamatorios y apoptóticos esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular puede derivar en la ruptura de la integridad anatómica generando la pérdida de la tolerancia inmunológica [67, 98].

Alteraciones en la apoptosis/fagocitosis de cuerpos apoptóticos se asocian con diferentes patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y enfermedades autoinmunes [99-101]. Por una parte, la deficiencia o exacerbación en el proceso apoptótico conducen a la pérdida de la homeostasis tisular y consecuente pérdida de función en diversos tejidos y órganos [98]. Las enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer o de Parkinson están asociadas a una muerte excesiva de células neuronales [100]. Por otro lado, una ineficiente remoción de los cuerpos apoptóticos puede contribuir al desarrollo de condiciones de inflamación crónica como se mencionó anteriormente. La remoción de cuerpos apoptóticos previene la liberación del contenido intracelular potencialmente inflamatorio e inmunogénico. Si su remoción no ocurre adecuadamente las células apoptóticas pueden experimentar una necrosis secundaria que al perder la integridad de la membrana liberan y exponen antígenos intracelulares y ADN. Estos componentes podrían proveer el estímulo inmunogénico para la producción de autoanticuerpos. Se ha visto que ratones deficientes para MFG-E8 (receptor que reconoce a la fosfatidilserina) que tienen disminuida 4 veces su capacidad fagocítica, desarrollan un fenotipo similar al lupus sistémico eritematoso [102]. Adicionalmente, se ha reportado que macrófagos derivados de pacientes con LES presentan defectos en la fagocitosis de células apoptóticas como en la producción de citoquinas durante dicho proceso [103, 104]. Asimismo, en enfermedades inflamatorias respiratorias crónicas como la fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma se encontraron grandes cantidades de células apoptóticas en el tejido pulmonar [105] y los macrófagos alveolares de estos pacientes presentan disminuida su capacidad fagocítica respecto a macrófagos de pacientes sanos [106]. Estas evidencias llevaron a diversos investigadores a plantear la posibilidad de favorecer la fagocitosis como tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas [107]. Por otro lado las placas ateromatosas de pacientes con aterosclerosis se caracterizan por una deficiente remoción de macrófagos apoptóticos que entran en necrosis secundaria generando un núcleo necrótico inestable que favorece un estado de inflamación crónica [107].

Finalmente, la inflamación crónica también se ha asociado a una activación aberrante de los TLRs generando tanto una sobreproducción de citoquinas y quimioquinas

inflamatorias como una inapropiada activación de células presentadoras de antígeno culminando en la iniciación y/o perpetuación de respuestas autoinmunes e injuria tisular [67]. Modelos murinos de LES, por ejemplo, presentan un fenotipo más leve de la enfermedad si son deficientes para los receptores TLR2 o TLR4, lo que evidencia el rol de dichos receptores en la perpetuación de la respuesta inflamatoria [108]. Por otro lado, tanto en células mononucleares totales como en fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoidea se encontró incrementada la expresión de distintos tipos de receptores TLR [109].

## Capítulo 3

### **Péptido intestinal vasoactivo**

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un neuropeptido de 28 aminoácidos que fue aislado por primera vez en 1970 del tracto gastrointestinal por Sami Said [110]. Pertenece a la familia de péptidos de glucagon-GRF-secretina por su similitud estructural. Este péptido es expresado y producido por neuronas en distintas áreas del sistema nervioso central y periférico, por células endocrinas como los lactotrofos de la hipófisis y páncreas y por células del sistema inmune. Su amplia distribución refleja su efecto pleiotrópico actuando como neurotransmisor, regulador inmune, vasodilatador y secretagogo [111, 112]. De hecho, como se mencionó anteriormente, VIP estimula la secreción de agua y electrolitos inducida por acetilcolina como también es un potente estímulo para la secreción de proteínas en glándulas salivales. A su vez se ha descrito un efecto trófico del VIP en el epitelio de glándulas submaxilares [113] y describimos recientemente su efecto anti-apoptótico en acinos de glándulas submaxilares de ratones NOD [36].

Por otro lado, durante la gestación temprana VIP participa en la interacción de células trofoblásticas e inmunes con un efecto inmunomodulador por acción sobre receptores VPAC [114, 115]. Además de neurotransmisor e inmunomodulador, el VIP induce la diferenciación neuronal en embriones de ratón entre los días 9 y 12 de gestación [116]. Estos últimos efectos podrían estar relacionados con una acción anti-apoptótica sobre distintos tipos celulares como se describió en astrocitos neonatales [117] y en acinos de glándula submaxilar de ratón [36].

VIP actúa a través de receptores pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR): VPAC1 y VPAC2 de alta afinidad y PAC1 de baja afinidad. Estos receptores al unirse con su ligando estimulan principalmente la vía de AMPc/PKA y en menor medida la de inositol trifosfato/fosfolipasa C (IP3/PLC), MAPK e inhibición de NFκB. En el sistema inmune el receptor VPAC1 es constitutivo y se expresa en linfocitos T, monocitos, células dendríticas y neutrófilos, en cambio el VPAC2 es inducible por estimulación de la molécula CD3 en linfocitos T o por LPS en macrófagos. PAC1 une VIP con mucha menor afinidad y solo se expresa en macrófagos y monocitos [118, 119].



Con referencia a los efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores del VIP en distintos sistemas *in vitro* e *in vivo*, se ha observado en macrófagos estimulados con LPS que el VIP inhibe la producción de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, disminuye la expresión de la iNOS y promueve la producción de IL-10. Se sabe que estos efectos se deben en parte a la supresión de la activación de NF- $\kappa$ B [112]. Por otro lado VIP puede diferenciar células dendríticas a un perfil tolerogénico con secreción de altos niveles de IL-10 para participar en la inducción de Treg [120]. En relación a los linfocitos T, VIP disminuye la relación Th1/Th2 e induce células Treg [121].

Esta capacidad anti-inflamatoria e inmunomoduladora vuelve al VIP atractivo como molécula candidata para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes del tipo Th1. La administración de VIP en modelos murinos de artritis reumatoidea [122], enfermedad de Crohn [123] y síndrome de Sjögren [124] retrasa la aparición de la enfermedad y reduce la frecuencia y severidad de las manifestaciones.

El VIP ha ingresado a ensayos clínicos como droga candidata para tratar la inflamación relacionada con hipertensión pulmonar. Aunque los resultados son prometedores, debido a su escasa biodisponibilidad se llevan adelante estrategias farmacológicas para adaptar la molécula o generar análogos de posible uso terapéutico. Una de ellas plantea el uso de sistemas de distribución en formulaciones liposomales que eviten la inactivación enzimática de VIP incrementando el tiempo de vida media y la estabilidad [125, 126].

Finalmente, la presencia y actividad del sistema VIP/VPAC en diversas células ponen de manifiesto su posible valor como biomarcador en procesos patológicos. La identificación de marcadores es esencial para el diseño de estrategias terapéuticas personalizadas. Estudios recientes en pacientes con artritis temprana han demostrado luego de 2 años de seguimiento que la actividad de la enfermedad correlaciona inversamente con los niveles séricos de VIP. Pacientes con niveles basales bajos de VIP presentaron una mayor actividad de la enfermedad y tuvieron que recibir tratamientos más intensivos [127]. Por otro lado en pacientes con espondilo-artritis temprana, niveles séricos bajos de VIP se asociaron con un elevado *score* de actividad de la enfermedad. En esos mismos pacientes también se asoció los bajos niveles de VIP en el

suero con la coexistencia de psoriasis y entesitis [128], aportando nuevas evidencias al potencial del VIP como biomarcador de pronóstico.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

*La hipótesis de este trabajo es que en el síndrome de Sjögren tienen lugar alteraciones en la expresión y funcionalidad del sistema del VIP y sus receptores VPAC1 y VPAC2 en las glándulas salivales, los cuales subyacen a la pérdida de la homeostasis tisular y al aumento de apoptosis de células epiteliales. Hipotetizamos que este mayor número de células apoptóticas en las glándulas no es removido por macrófagos en forma eficiente ni 'silenciosa' favoreciendo una respuesta pro-inflamatoria que no es adecuadamente inhibida por VIP.*

### **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta tesis es analizar la expresión y actividad del sistema VIP/VPAC en relación al mantenimiento o pérdida de la homeostasis tisular de las glándulas salivales, con especial foco en la fagocitosis de células apoptóticas.

Mediante el estudio de estos aspectos en el modelo NOD de SS en ratones adultos o en el período de desarrollo embrionario y de ratones deficientes en VIP, como también en diseños *in vitro* de interacción de células inmunes de pacientes con SSp y células epiteliales humanas, esperamos aportar información básica relevante en la búsqueda de nuevos marcadores de SSp, detectables junto con el diagnóstico de los primeros síntomas y signos de disfunción secretoria.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

#### Modelos murinos

- 1- Analizar la expresión del sistema VIP/VPAC en glándulas submaxilares de ratones NOD adultos de distintas edades y controles BALB/c.
- 2- Estudiar la expresión y actividad de VIP y sus receptores VPAC en el desarrollo embrionario de glándulas salivales de ratones NOD y controles.
- 3- Evaluar la estructura, funcionalidad y fenotipo de glándulas salivales de ratones deficientes en VIP.
- 4- Analizar la fagocitosis de acinos apoptóticos por macrófagos peritoneales de ratones

NOD y controles BALB/c, evaluar su perfil de activación y explorar la modulación por VIP.

### Modelo *in vitro*

5- Evaluar el efecto del VIP y la expresión de sus receptores en monocitos de pacientes con SSp y de voluntarios sanos en condiciones basales o estimulados *in vitro* con LPS.

6- Analizar la función fagocítica de monocitos de pacientes con SSp y controles frente a células epiteliales de glándula submaxilar humana (línea HSG) inducidas a apoptosis.

7- Evaluar el perfil de activación de los monocitos de SSp y de sujetos controles luego de la interacción *in vitro* con células epiteliales de glándula submaxilar humana.

8- Estudiar el perfil de activación de células HSG luego de la interacción con células mononucleares de pacientes con SSp y controles. Determinar el efecto del VIP en la fagocitosis y en la interacción inmune-epitelial.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MODELOS MURINOS**

Como modelo murino de Síndrome de Sjögren se utilizaron ratones de la cepa NOD (diabéticos no obesos) y como controles ratones BALB/c del mismo sexo y edad. Los animales fueron mantenidos con ciclos de luz y oscuridad [12:12] y temperatura constantes en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN, UBA). Los animales fueron monitoreados para determinar los niveles de glucosa en sangre y considerados normoglucémicos pre-diabéticos, ya que sus niveles de glucosa, tomados 2 veces en un período de 24 h, no variaron significativamente de los controles ( $1,0 \pm 0,1$  g/l, n=23) (Wiener Lab, Rosario, Argentina). En algunos ensayos los ratones fueron ayunados previo a la medición de flujo salival aunque se mantuvieron con agua *ad libitum*.

Para los ensayos de glándulas submaxilares embrionarias se utilizaron hembras preñadas entre los días 13 y 17 de gestación. Las mismas se colocaron en apareo con machos de la misma cepa. La cópula se constató por observación de tapón mucoso vaginal. A partir de la observación del mismo se separó a la hembra y se mantuvo con agua y alimento *ad libitum* hasta el día de preñez requerido.

Los ratones deficientes en VIP (C57B6 VIP<sup>-/-</sup>), obtenidos por inserción del gen de resistencia a la neomicina en orientación reversa en el exón 4 del gen de VIP, fueron cedidos gentilmente por el Dr James Waschek de la Universidad de California, Los Ángeles, EEUU. Los ratones se encuentran alojados en el Bioterio Central de la FCEyN, UBA. Su genotipo fue determinado por PCR al día del destete.

Todos los ensayos se realizan de acuerdo a los protocolos estándares establecidos por el Comité de Ética y Cuidado Animal y por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

### **PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO (SSp) Y VOLUNTARIOS SANOS**

Se seleccionaron pacientes que reúnen los Criterios para síndrome de Sjögren primario

de acuerdo al Consenso Americano-Europeo (2002). Todas las pacientes fueron mujeres que asisten a la Unidad de Reumatología del Departamento de Medicina del CEMIC, Buenos Aires, Argentina. La edad, manifestaciones extraglandulares, duración de la enfermedad y tratamiento están indicados en la tabla 1 a continuación:

Participantes	Edad	Manifestaciones extraglandulares	Duración	Tratamiento
<b>pSS (n=38)</b>	29-79 55.9±11.9	Tiroiditis Autoinmune (7), Vasculitis cutánea (2), Fenómeno de Raynaud (4), Sinovitis (2)	3-31 12.19±9.85	Hidroxicloroquina (19), Levotiroxina (6), Corticosteroides (3), Pilocarpina (1)
<b>Control (n=16)</b>	24-61 42.2±13.15	N/A	N/A	N/A

**Tabla 1:** Características de los pacientes con síndrome de Sjögren primario y controles que participaron en el estudio. Todos los pacientes reunían los criterios de pSS de acuerdo al Consenso Americano-Europeo [1]. Todos fueron positivos para anticuerpos anti-Ro (SS-A). N/A: no aplica. Edad y duración de la enfermedad están expresados en años. Se indica el rango y  $X \pm E.S.$

Los voluntarios sanos fueron adultos de entre 24 y 61 años que accedieron voluntariamente a la extracción de una muestra de sangre y no recibían al momento de la extracción ningún medicamento. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (Protocolo 37/09) y los sujetos participantes, pacientes y controles, firmaron un consentimiento informado aprobado por dicho Comité.

### LÍNEA CELULAR DE GLÁNDULA SUBMAXILAR HUMANA (HSG)

La línea celular HSG se estableció a partir de la glándula salival de un paciente hombre de 54 años de edad. Esta línea celular retiene características secretorias y marcadores de fenotipo epitelial de glándula salival. Las mismas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Bruce Baum (NICDH-NIH, Bethesda, MD, USA). Estas células crecen en monocapa y se repican en dilución 1:10 cada 3-4 días excepto que se las cultive sobre una matriz extracelular reducida en factores (Matrigel, BD) conteniendo factores de crecimiento en cantidades limitadas, donde se favorece la formación de estructuras tridimensionales y 'clusters' o agrupamientos celulares con características comparables a los acinos, que dan positiva la prueba de liberación de amilasa [129].



## PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

### 1. Cultivos primarios con células de ratones

Los ratones de correspondiente edad, cepa y sexo fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical por la mañana y, luego de aislar los tejidos u órganos de interés, fueron dispuestos según el protocolo aprobado por la CICUAL y el Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEyN, UBA.

#### 1.1. Macrófagos peritoneales

Los macrófagos fueron obtenidos por inyección intra-peritoneal de una solución de Hanks (Gluc 5,5mM+ NaCl 136,7mM + KCl 5,3mM + H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 0,3mM + HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.H<sub>2</sub>O 0,3mM + NaHCO<sub>3</sub> 4,16mM pH 7,2 + 10% SFB (Bioser) y 1% de ATB (Gibco)) enfriado en hielo granizado. La zona peritoneal fue masajeadada durante 2 a 3 minutos y el contenido fue recuperado y centrifugado durante 10 min a 300g a 4°C. Luego de la centrifugación las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 completo (10% SFB (Bioser) + 1% de ATB (Gibco)). Una dilución 1/10 de las células fue utilizada para su cuantificación en cámara de Neubauer. Luego de la cuantificación, 5x10<sup>5</sup> o 1x10<sup>6</sup> células según el experimento a realizar fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos e incubadas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> durante dos horas para el pegado de los macrófagos. Pasado ese tiempo, las placas fueron lavadas dos veces con RPMI 1640 completo. La población obtenida alcanzó una pureza mayor al 80% por marcación con F4/80 y determinación por citometría de flujo. Las células fueron incubadas con los tratamientos y el tiempo adecuado según el experimento. La concentración de VIP (Polypeptide) que se utilizó fue 100 nM.

#### 1.2. Acinos de glándula submaxilar

Las glándulas submaxilares fueron removidas e inmediatamente transferidas a RPMI 1640 + SFB 10%. Para cada experimento los tejidos procedentes de unas 10 glándulas submaxilares obtenidas de hembras de 16 semanas NOD y BALB/c fueron fraccionadas y digeridas en RPMI que contenía colagenasa IV (Sigma-Aldrich) 100U/ml, 10%SFB y 0,1g/L de inhibidor de tripsina de soja (Sigma-Aldrich) a 37°C con agitación en un baño termostático durante 10 minutos (120 ciclos/minuto), disgregadas con una pipeta

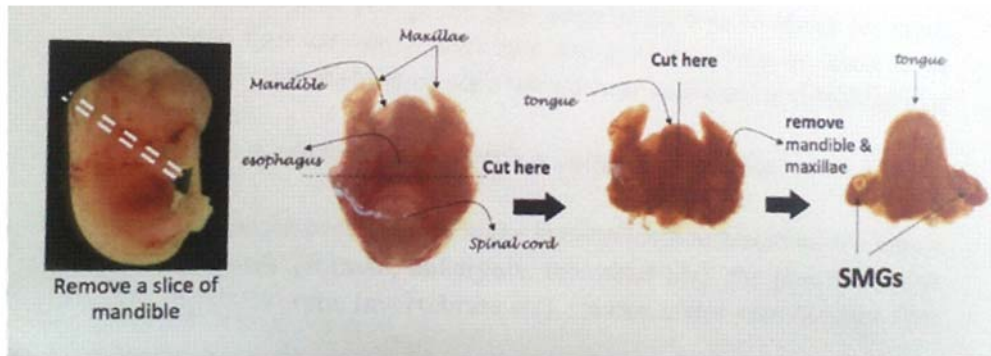
pasteur y filtrado a través de una malla de nylon (150 *mesh*). Las células acinares se centrifugaron 3 veces a 400g durante 10 segundos con medio RPMI fresco + 10%SFB. Se sembraron en placas de 24 pocillos con fondo plano y se incubaron durante 2 h a 37°C en un incubador humidificado con 5% dióxido de carbono para separar las células acinares de las células inmunes adherentes. La suspensión purificada presentó una población homogénea de células acinares con una cantidad mínima de células inmunes mononucleares ( $\leq 5\%$ ). La viabilidad de la suspensión de células fue obtenida por tinción con naranja de acridina/ioduro de propidio y azul Trypan. Los acinos resultantes fueron sembrados (normalizado por mg proteína medido por microBCA, Pierce) y cultivados en RPMI 1640 10%SFB con los tratamientos y el tiempo adecuado según el experimento a realizar. Las concentraciones de drogas que se utilizaron fueron 10 y 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  y 100 nM de VIP.

### **1.3 Co-cultivos de macrófagos peritoneales y acinos de glándula submaxilar**

Se co-cultivaron macrófagos peritoneales con acinos de glándula submaxilar durante distintos tiempos según se especifica para cada experimento. Luego de ese tiempo los macrófagos peritoneales adheridos en el fondo de la placa fueron lavados intensivamente y resuspendidos con medio RPMI completo e incubados a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> por 6 o 24 h. Terminado ese tiempo fueron recuperadas las células (cultivo de 6 h) para estudiar la expresión del mensajero de diversas proteínas por RT-PCR y los sobrenadantes (cultivos de 24 h) para determinar la producción de citoquinas y nitritos como se indica a continuación.

### **1.4. Cultivos de glándulas submaxilares embrionarias**

A hembras preñadas en distintos días de gestación se les practicó eutanasia y se extrajeron los embriones que se lavaron con PBS. Para obtener las glándulas salivales se aisló la cabeza del embrión y se hizo una línea de corte a través de la mandíbula. Luego bajo microscopio se aisló la glándula salival como se muestra en la figura F.



**Figura F: Representación esquemática de los pasos de disección para la obtención de glándulas submaxilares embrionarias.** Tomado de protocolos del laboratorio del Dr Mathew Hoffman en NIDCR, NIH, Bethesda, USA

Se plaquearon un mínimo de 3 glándulas en 200  $\mu$ l de medio DMEM:F12 suplementado con vitamina C y transferrina sobre una membrana de policarbonato con poro de 0,2  $\mu$ m. Se realizaron cultivos según los tiempos indicados en los distintos ensayos y las glándulas salivales se fijaron en PFA 4% o Ac:Me según corresponda para inmunofluorescencia o se pusieron en Trizol para extracción de RNA.

## 2. Medición de flujo salival y electrolitos en saliva de ratones

La medición del flujo salival de ratones NOD, C57/B6 VIP  $-/-$  y controles se realizó por pesada de la saliva acumulada en la cavidad bucal como se describió previamente [130]. Brevemente, se recolectó saliva durante 10 minutos con una micropipeta y se colocó en tubos eppendorf mantenidos a 4°C. El volumen recolectado fue cuantificado por diferencia de peso de los microtubos.

No se observó secreción basal de saliva en ausencia de estímulo secretorio, por lo cual la saliva fue recogida después de inyectar intra-peritonealmente el agonista muscarínico pilocarpina (Sigma Aldrich, EEUU) en una dosis 50  $\mu$ g/100 g de peso corporal. Los resultados de flujo se expresaron en  $\mu$ l de saliva por min por 100 g de peso corporal. La determinación de electrolitos (Na, K, Cl) de la saliva recolectada se realizó por el método de potenciometría indirecta utilizando el elemento analítico modular Cobas 6000 (Roche).

### **3. Cultivo de línea celular humana**

Las células HSG fueron cultivadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en 3 ml de medio DMEM-F12 (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, glutamina 2mM (Sigma-Aldrich), streptomycin 100 U/ml y penicilina 100 µg/ml (Invitrogen) (DMEM-F12 completo). Las células fueron crecidas en monocapa en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y se reemplazó el medio cada 48 h en condiciones de esterilidad dentro de un flujo laminar clase II (BLUspace, PBI).

Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 70% de confluencia, fueron levantadas por tratamiento con 1 ml de Tryple™ (Invitrogen) a 37°C. Una vez despegadas, una alícuota de las células se resuspendió en 3 ml de medio fresco y se cultivó en una botella nueva.

Para la criopreservación de las células, las suspensiones celulares obtenidas luego del tratamiento con Tryple™ se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación (10% DMSO en SFB) en frío. Dicha suspensión se alicuotó en criotubos y luego se enfrió gradualmente desde una temperatura de -20°C hasta N<sub>2</sub> líquido.

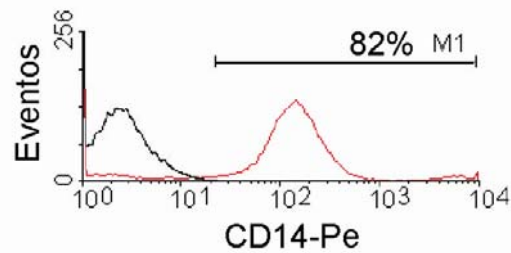
Para la realización de experimentos, las células epiteliales fueron cultivadas en placas *multiwell* de 24, 48, 96 pocillos en medio DMEM-F12 hasta alcanzar un 70% de confluencia. Luego fueron tratadas e incubadas por distintos períodos de tiempo y procesadas para las distintas técnicas evaluadas.

### **4. Aislamiento de células mononucleares totales de sangre periférica (MNT) y monocitos humanos**

Las células MNT se obtuvieron a partir de sangre periférica anticoagulada con heparina proveniente de pacientes con SSp y de controles. Luego de realizar un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech) y centrifugación durante 20 min a 2000 rpm, el halo correspondiente a las MNT se recuperó, se lavó con solución fisiológica y se resuspendió en medio DMEM-F12 completo. Las células MNT fueron contadas en cámara de Neubauer y utilizadas en los experimentos.

Los monocitos se aislaron por adherencia o por selección positiva utilizando un kit de purificación para células CD14+ (Miltenyi) con una pureza alrededor del 80% o mayor al 95 % respectivamente que se determinó por marcación de CD14+ por citometría de

flujo en cada experimento y se indica en las figuras correspondientes según el caso.



**Figura G: Procentaje de pureza de monocitos obtenidos por adherencia a superficie plástica.** Se determinó por citometría de flujo el % de pureza de la muestra mediante marcación con anti-CD14PE.

### **4.1. Co-cultivos de células epiteliales de glándula submaxilar (HSG) y células mononucleares de pacientes con Síndrome de Sjögren o controles**

Se co-cultivaron células HSG en 70% de confluencia con células mononucleares totales de sangre periférica (MNT), previamente purificadas, durante distintos períodos de tiempo y bajo diversos estímulos. Los co-cultivos se realizaron con contacto directo de las células o en dispositivos tipo *Transwell* con poro de 0,4  $\mu\text{m}$  que previenen el pasaje de células entre los compartimientos según se indica en cada caso. A partir de los co-cultivos se recuperó el medio condicionado (MC) para los ensayos de funcionalidad de las células epiteliales (ensayos de cierre de la herida y de diferenciación).

## **5. Ensayos de Fagocitosis**

### **5.1. Fagocitosis por macrófagos murinos**

Para determinar fagocitosis los macrófagos peritoneales fueron cultivados sobre cubreobjetos. Seguidamente fueron co-cultivados durante 30, 60 o 90 minutos con acinos apoptóticos. Luego de ese tiempo los macrófagos peritoneales adheridos en el fondo de la placa fueron lavados 3 veces y fijados con metanol frío durante 10 min en freezer de  $-20^{\circ}\text{C}$  para luego realizar una tinción con hematoxilina y eosina y determinar el porcentaje de fagocitosis [número de macrófagos que contiene al menos una célula apoptótica en un campo de 100 células] y el índice de fagocitosis [cantidad de células ingeridas por los macrófagos en un campo de 100 células/100] por microscopía óptica de contraste de fase.

### **5.2. Fagocitosis por monocitos humanos**

Los monocitos aislados como se describió anteriormente fueron co-cultivados con células HSG apoptóticas. Para inducir apoptosis las células HSG fueron tratadas previamente durante 24 horas con staurosporina 50 nM. Este tratamiento induce un porcentaje de apoptosis de aproximadamente 30% determinado por citometría de flujo por marcación de Anexina V/Ioduro de Propidio. Luego las mismas fueron marcadas con CFSE.

Luego de 60, 90 o 120 minutos de incubación de los monocitos con células apoptóticas, según corresponde, los monocitos fueron lavados 3 veces con PBS para eliminar las células HSG que no fueron fagocitadas. Luego las células fueron levantadas por tratamiento con Tryple™ durante 10 minutos. La suspensión de células obtenida fue marcada con anticuerpo anti-CD14PE o anti-CD14PeCy5 para luego determinar el porcentaje de células CD14+CFSE+ por citometría de flujo.

## **6. Ensayos funcionales sobre la línea celular HSG**

### **6.1. Ensayos de reparación de la herida**

Se plaquearon 40.000 células HSG en placa de 96 pocillos para obtener una confluencia del 100%. Luego con un *tip* p10 se realizó una herida en la monocapa, la cual fue fotografiada para determinar el tamaño de la herida a tiempo 0. Luego se pusieron los distintos medios condicionados (CM) utilizados y se dejaron durante 24 o 48 horas en cultivo. Pasado ese tiempo fueron fotografiadas nuevamente y se determinó mediante el programa ImageJ el % de cierre de la herida.

### **6.2. Ensayo de diferenciación celular a acinos**

Células HSG fueron plaqueadas sobre una capa de Matrigel reducida en factores de crecimiento (Becton Dickinson). Dicha matriz celular induce la diferenciación de la línea celular a un fenotipo acinar. Para estudiar el efecto de los MC en la diferenciación celular, las células HSG fueron plaqueadas sobre el Matrigel en presencia de los medios condicionados. Luego de 24 horas de cultivo se determinó el grado de diferenciación celular mediante microscopía.

### 7. RT-PCR

#### 7.1 Extracción de ARN

Las células recuperadas luego de los distintos tratamientos fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de Trizol (Invitrogen) y se procedió a realizar la extracción de ARN total siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, luego de incubar las muestras en presencia de 100  $\mu$ l cloroformo durante 5 min, se centrifugaron 15 min a 12.000 rpm a 4°C. El ARN se encuentra disuelto en la fase acuosa la cual se transfirió a un tubo nuevo y para precipitarlo se incubó 10 min a 4°C con 250  $\mu$ l de isopropanol y luego se centrifugó 10 min a 12.000 rpm en frío. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 500  $\mu$ l de etanol 75%. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua DEPC 0.1% libre de RNAsas. El ARN se cuantificó utilizando el sistema de nanodrop (Thermo Scientific).

#### 7.2 Retro-transcripción

Se realizó el pasaje a ADN copia (ADNc) utilizando el kit comercial Ready-to-Go T-Primed First Strand (Amersham Pharmacia). Se tomaron 2.5  $\mu$ g de ARN, se resuspendieron en H<sub>2</sub>O DEPC llegando a un volumen final de 33  $\mu$ l y se incubaron 5 min a 65°C. Los tubos del kit Ready-to-Go T-Primed First Strand y el ARN se incubaron 5 min a 37°C y luego las muestras se transfirieron a los tubos del kit y nuevamente se incubaron a 37°C por 5 min. Los tubos se vortexearon, se centrifugaron brevemente y la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 h. El ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

#### 7.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Los *primers* utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa *Primer 3* disponibles en internet. Las secuencias de los mismos se detallan en la Tabla 2.

Primers	Secuencia
<b>GAPDH</b>	Sentido: 5' TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G 3' Antisentido: 5' TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT 3'
<b>VPAC1 m</b>	Sentido: 5' GTG AAG ACC GGC TAC ACC AT 3' Antisentido: 5' TGA AGA GGG CCA TAT CCT TG 3'
<b>VPAC2 m</b>	Sentido: 5' CAG CAA AGT CCC TGA TGA CA 3' Antisentido: 5' AGA GGT GGT GTA AGC CAT GC 3'
<b>VIP m</b>	Sentido: 5' TTCACCAGCGATTACAGCAG 3' Antisentido: 5' TCACAGCCATTTGCTTTCTG 3'
<b>Cdh1 m</b>	Sentido: 5' GACTGGAGTGCCACCACCAAAGAC 3' Antisentido: 5' CGCCTGTGTACCCTCACCATCGG 3'
<b>Aqp5 m</b>	Sentido: 5' TCTACTTCTACTTGCTTTTCCCTCCTC 3' Antisentido: 5' CGATGGTCTTCTCCGCTCCTCTC 3'
<b>Tubb3m</b>	Sentido: 5' CCAGAGCCATCTAGCTACTGACACTG 3' Antisentido: 5' AGAGCCAAGTGGACTCACATGGAG 3'
<b>S29m</b>	Sentido: 5' GGAGTACCCACGGAAGTTCGG 3' Antisentido: 5' GGAAGCACTGGCGGCACATG 3'
<b>Cldn8</b>	Sentido: 5' TGCCAATCCATCATCAGAGACTTC 3' Antisentido: 5' ACAACAGAACAGTGCTCCTCCAG 3'
<b>Cytokeratin 19</b>	Sentido: 5' GCCACCTACCTTGCTCGGATTG 3' Antisentido: 5' GTCTCTGCCAGCGTGCCTTC 3'
<b>VPAC1h</b>	Sentido: 5' CCCCTGGGTCAGTCTGGTG 3' Antisentido: 5' GAGACCTAGCATTGCTGGTG 3'
<b>VPAC2h</b>	Sentido: 5' CCAGATGTCGGCGGCAACG 3' Antisentido: 5' GCTGATGGGAAACACGGCAAAC 3'
<b>CD14 h</b>	Sentido: 5' CAAGTGTGAAGCCTGGAAGCCG 3' Antisentido: 5' AGCAGCAACAAGCAGGACGC 3'
<b>TLR3h</b>	Sentido: 5' GTGCCGTCTATTTGCCA 3' Antisentido: 5' AGTCTGTCTCATGATTCTGTTG 3'
<b>TLR4 h</b>	Sentido: 5' CGTGAGACCAGAAAGCTG 3' Antisentido: 5' ATAGCTGCCTAAATGCCTC 3'
<b>MCP-1 h</b>	Sentido: 5' CAGCAGCAAGTGCCCAAAG 3' Antisentido: 5' GAGTGAGTGTCAAGTCTTCGG 3'
<b>IL-6h</b>	Sentido: 5' CAGATTTGAGAGTAGTGAGGAAC 3' Antisentido: 5' CGCAGAATGAGATGAGTTGTC 3'

**Tabla 2: Secuencia de primers empleados para el análisis de la expresión génica.**

La PCR se realizó mezclando el ADNc con la mezcla de PCR (Buffer PCR 10X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, primers 0,25 µM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 25 U/ml, H<sub>2</sub>O) para completar



un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l.

### **7.4 Electroforesis en gel de agarosa y semicuantificación de los productos de RT-PCR**

Después de realizada la amplificación por RT-PCR, se analizaron 10  $\mu$ l de cada producto mezclado con el buffer de siembra (0,25% xileno, 40% glicerol en buffer TBE) en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5% de bromuro de etidio en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb de ADN (BioRad). La electroforesis se realizó en TBE a 140 V por 20 min. Las bandas obtenidas se visualizaron por fluorescencia del bromuro de etidio expuesto a luz UV. El área de dichas bandas fue cuantificada utilizando el programa Scion Image 4.0 (NIH, USA) y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias [UA] relativas a GAPDH.

### **8. Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real**

Para la determinación de la expresión de mensajeros por PCR a tiempo real se utilizó la mezcla FastStart SYBR Green Master Mix (Roche) y los primers correspondientes de la Tabla 1 (0,25  $\mu$ M). Las reacciones fueron realizadas en el sistema de detección MyIQTM2 Real-Time PCR (Bio-Rad). Los datos fueron analizados con el programa IQTM5 v2.1 (Bio-Rad) utilizando el método comparativo de Ct y GAPDH o S29 como control interno. Los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o  $2^{-\Delta Ct}$ .

### **9. Determinación de nitritos**

Se determinaron los niveles de nitritos en los sobrenadantes de cultivos a través del método de Griess. Se realizó una curva estándar con una solución concentrada de  $\text{NaNO}_2$  desde una concentración de 0 a 100  $\mu$ M. Los estándares y las muestras (100  $\mu$ l) fueron incubados con 50  $\mu$ l de sulfanilamida y con 50  $\mu$ l de naftil-etilen-diamina (NEDA) durante 10 min en oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 540 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol de nitritos/litro.

### **10. ELISA para citoquinas**

Para la cuantificación de citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivos se realizaron ELISAs sándwich siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes.

Brevemente, el anticuerpo específico para cada citoquina (IL-10 y TNF- $\alpha$ ) esta adsorbido a la placa. Luego se bloqueó la placa con PBS-BSA 2% y los estándares provistos por los equipos y las muestras se incubaron en el soporte sólido durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con solución de lavado (Tris 50 mM pH 7,2, Tween 0.2%) y se agregó el Ac. policlonal conjugado con biotina (BioRad) para cada citoquina en la dilución correspondiente durante 1 h. Luego del lavado se incubó con la streptoavidina conjugada a HRP durante 1 h 30 min y, finalmente, se reveló con el sustrato OPD 2  $\mu$ g/ml en buffer citrato pH 5 con 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por ml de OPD durante 20 min. La reacción se detuvo con la solución STOP (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N) y la densidad óptica se leyó a 450 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). Los resultados se expresaron en pg/ml o ng/ml.

### **11. RIA para PGE<sub>2</sub>**

El nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) liberado por los macrófagos se estudio mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) con un anticuerpo específico (Cayman). Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de macrófagos peritoneales fueron extraídos y reconstituidos en buffer RIA de PG. A partir de una solución madre de PGE<sub>2</sub> (Sigma Aldrich) se construyó la curva de calibración haciendo diluciones seriadas (15-4000 pg). Luego de la adición del antisuero se incubó 30 min a 4°C, se adicionó la prostaglandina marcada (Amersham: [5,6,8,9,11,12,14,15 (n)-<sup>3</sup>H]-prostaglandina E<sub>2</sub> (130Ci/mmol, 100 $\mu$ Ci/ml) y se incubó durante 1h a 4°C. Se separó PGE<sub>2</sub> libre y unida por el agregado de una suspensión de carbón activado (1%) – dextran (0,1%) seguida de una centrifugación a 2000g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se volcó en viales con 2 ml de líquido de centelleo (Optiphase Hi-Safe III de Perkin Elmer) para muestras acuosas. La radioactividad se cuantificó con un contador de centelleo (Beckman). Para obtener una distribución normal de los datos se aplicó una transformación logarítmica. Los datos se expresaron como pg PGE<sub>2</sub>/10<sup>6</sup> células/1h. El método posee una sensibilidad de 5pg/tubo y la reactividad cruzada es menor al 0,1%.

### **12. Estudios histológicos**

Para los estudios histológicos de morfología, proporción y estructura de acinos y

ductos de las glándulas salivales de ratones NOD, deficientes en VIP y controles, las mismas fueron fijadas en paraformaldehído 4% en PBS durante 48 hs a temperatura ambiente. Luego de la fijación se procedió a la deshidratación del tejido pasándolo por soluciones de concentraciones crecientes de alcohol y xilol. Posteriormente se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 8-10  $\mu\text{m}$  con un micrótomo y se montaron sobre portaobjetos.

### 12.1. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Cortes histológicos previamente desparafinados o los macrófagos fijados con metanol frío se introdujeron en hematoxilina de Harris durante 3 minutos, luego se lavaron con abundante agua corriente y se tiñeron con eosina durante 1 minuto y se lavaron y montaron en medio de montaje.

### 13. Inmunofluorescencia

Las glándulas embrionarias se fijaron con PFA4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se permeabilizaron con Triton 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego se bloquearon las interacciones inespecíficas utilizando BSA 1% (Bioser) en PBS durante 60 min, posteriormente se incubaron o.n. en cámara fría con los anticuerpos primarios como se indica en la tabla 3.

Se lavaron 3 veces con PBS-Tween e incubaron con una dilución de los distintos anticuerpos secundarios según indica la tabla, posteriormente se tiñeron las células con una solución de DAPI (Sigma Aldrich) (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 15 min, se realizaron dos lavados con agua bidestilada durante 5 min y se montaron los vidrios en PBS- Glicerol y se observaron en un microscopio confocal.

Anticuerpo Primario (dilución)	Anticuerpo Secundario (dilución)
Anti rabbit Tubb3 (1:200)	Rabbit-Cy3 (1:200)
Anti rat Ecad (1:100)	Rat -Cy2 (1:200)
Anti mouse Perlecan (1:400)	Mouse Cy5 (1:200)

Tabla 3: Anticuerpos empleados para la marcación por inmunofluorescencia

### **14. Citometría de flujo**

Las células cultivadas bajo los distintos tratamientos fueron recuperadas y lavadas con buffer FACS (2% SFB en PBS) a temperatura ambiente. Los *pellets* celulares obtenidos se resuspendieron y se incubaron con los anticuerpos correspondientes según la marcación como se detalla a continuación.

#### **14.1 Inmunofluorescencia de superficie directa**

Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron con buffer FACS (PBS 0,5%SFB) y se analizaron por citometría de flujo. En los controles negativos los anticuerpos fueron reemplazados por los correspondientes controles de isotipo.

#### **14.2 Inmunofluorescencia intracitoplasmática para proteínas**

Para la detección de proteínas intracitoplasmáticas, las células se incubaron con un inhibidor del transporte de proteínas (GolgiStop<sup>TM</sup>, BD) durante las últimas 4 a 6 h de cultivo, para promover la acumulación intracitoplasmática de proteínas por inhibición del transporte trans Golgi. Luego de realizar la marcación de superficie, las células se fijaron con una solución fijadora/permeabilizadora (Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>, BD) durante 20 min a 4°C y posteriormente se permeabilizaron por lavado con solución BD Perm/Wash<sup>TM</sup> (BD).

Los anticuerpos monoclonales se incubaron junto con el buffer de permeabilización durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el anticuerpo no pegado lavando en presencia de ese mismo buffer y se resuspendieron nuevamente en Cytofix/Cytoperm hasta su análisis por citometría. En forma paralela se realizaron las marcaciones con los correspondientes controles de isotipo.

En la tabla 4 se muestran todos los ACs monoclonales conjugados con los distintos fluorocromos empleados en distintas combinaciones.

Marcación	Especificidad	Fluorocromo Conjugado	Tipo de marcación	Procedencia
<b>Macrófagos murinos</b>	Anti-F4/80	FITC	Superficie	eBioscience
	Anti IL-10	PE	Intracitoplasmática	eBioscience
<b>Apoptosis</b>	Anexina V	FITC	Superficie	BD Pharmingen
<b>Monocitos humanos</b>	Anti- CD14	FITC	Superficie	BD Pharmingen
	Anti-CD14	PE	Superficie	BD Pharmingen
	Anti-IL10	PE	Intracitoplasmática	eBioscience
	Anti-IL12	PE	Intracitoplasmática	eBioscience

Tabla 4: Anticuerpos empleados para la marcación por citometría de flujo

Todas las muestras se analizaron en un citómetro de Flujo FacsAria II (BD) y se adquirieron entre 10.000 y 30.000 eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa WinMDI® versión 2.9 o FlowJo® y se expresaron como porcentaje de células positivas usando los correspondientes controles para determinar en cada caso el cuadrante o punto de corte.

### 15. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se estimó utilizando el Kit comercial micro-BCA Protein Assay (Pierce). Se agregaron parte iguales de muestra (100ul de una dilución 1/100) y de reactivo de trabajo y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Se midió la absorbancia a 570nm. Los valores obtenidos se extrapolaron a una curva estándar de BSA de concentraciones conocida.

### 16. Análisis estadístico.

La evaluación estadística se realizó aplicando la prueba de “t” de Student con dos colas para poblaciones independientes. Cuando comparaciones múltiples eran necesarias, la prueba de ANOVA con contrastes de Newman-Keuls fue utilizada. En algunos estudios se emplearon pruebas no paramétricas como Mann Whitney, Wilcoxon y post tests. Los análisis de asociación se realizaron con la prueba  $\chi^2$  y los de correlación se efectuaron con la prueba de Spearman, Todos los datos se procesaron con el programa Graphpad Prism 6. Las diferencias se consideraron significativas con  $P < 0,05$ .

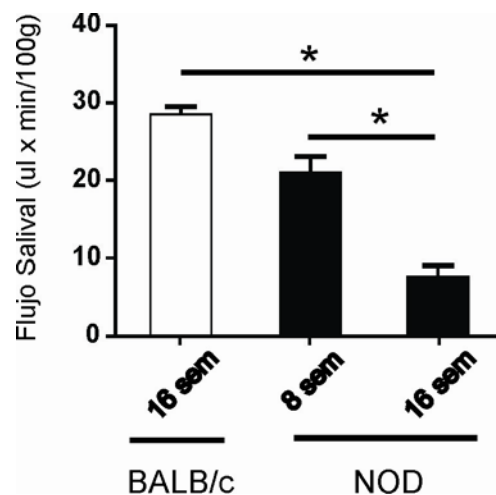
# **RESULTADOS**

## Capítulo 1

### PARTE I

#### Expresión del sistema VIP/VPAC en glándulas submaxilares de ratones NOD adultos

Una de los síntomas cardinales del Síndrome de Sjögren (SS) es la disfunción secretoria con manifestaciones histológicas y funcionales más evidentes en las glándulas salivales y lagrimales afectadas. Las hembras NOD, a diferencia de otros modelos murinos de SS, presentan una reducción progresiva del flujo salival con la edad. La figura 1 muestra la reducción del flujo salival en ratones NOD de 16 semanas comparado con controles BALB/c de la misma edad y con ratones NOD de 8 semanas. Los ensayos se realizaron previa inducción del flujo salival con el agonista muscarínico pilocarpina, ya que los roedores no presentan secreción basal de saliva en ausencia de un estímulo secretorio.



**Figura 1. Menor flujo salival en ratones NOD de 16 semanas.** Ratones NOD de 8 y 16 semanas y BALB/c de 16 semanas ayunados fueron inyectados con pilocarpina 0,05mg/100g peso por vía i.p. La saliva fue recolectada durante los siguientes 10 minutos y se determinó el flujo salival como se describe en Materiales y Métodos. Los valores indican  $X \pm E.S.$  de al menos 8 determinaciones en cada caso. \*  $P < 0,05$ .

Dado que la organización estructural de las glándulas exocrinas es crítica para una adecuada secreción salival, nos interesó estudiar las características histológicas de las glándulas para determinar posibles alteraciones en el parénquima glandular o señales de daño estructural que pudieran relacionarse con la pérdida funcional. Para esto se realizó una coloración de hematoxilina-eosina en cortes histológicos de glándulas

salivales de ratones NOD de 8 y 16 semanas como de controles. Observamos que las hembras de ratones NOD de 16 semanas de edad presentan una morfología alterada de las glándulas submaxilares con un aumento en la relación ductos-acinos en comparación con ratones NOD de 8 semanas de edad y ratones controles, indicativa de un defecto en la diferenciación de ductos a acinos y/o un aumento en la apoptosis de acinos. Encontramos que la morfología de los acinos se encuentra alterada con presencia de núcleos picnóticos correspondientes a células apoptóticas. Además se visualizaron focos de infiltración mononuclear principalmente con localización periductal a las 16 semanas aunque con una baja incidencia. En ratones normales se observaron solo algunos focos pequeños y aislados de células mononucleares.

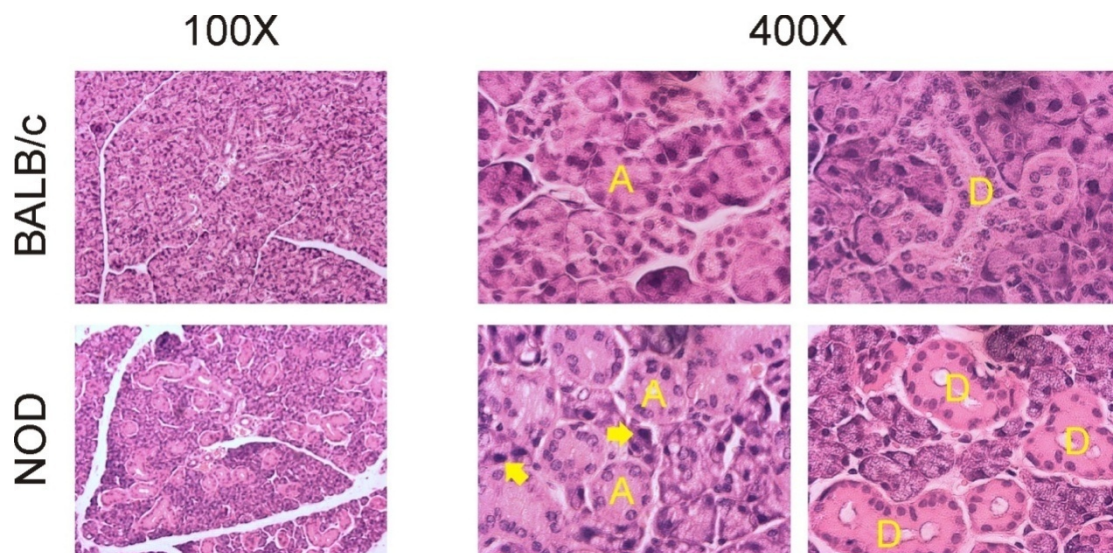
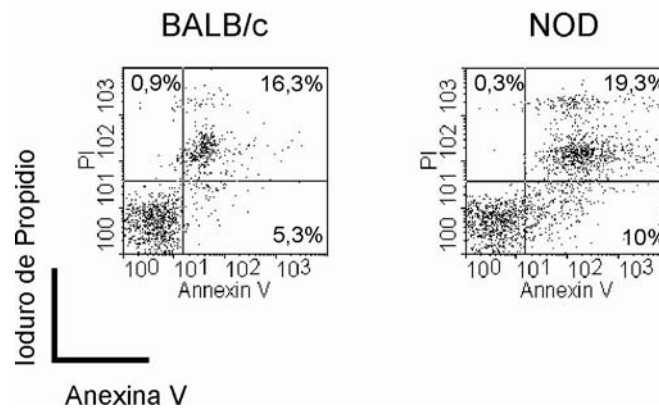


Figura 2: **Estructura alterada del parénquima glandular en ratones NOD de 16 semanas.** Glándulas salivales de ratones NOD fueron extraídas y fijadas en paraformaldehído 4% para luego realizar una tinción de hematoxilina-eosina de los cortes parafinados como se indica en Materiales y Métodos. Imágenes representativas de al menos 10 ratones de cada grupo tomadas en 400x. A: acinos, D: Ductos, Flechas marcan núcleos picnóticos.

Dado el daño estructural observado en las imágenes histológicas con presencia de células apoptóticas nos interesó estudiar la apoptosis en células acinares aisladas de las glándulas salivales. Para esto se aislaron acinos de glándulas submaxilares de ratones NOD y de controles BALB/c mediante disgregación enzimática y se los mantuvo en cultivo por 4 horas. Posteriormente se realizó una marcación con



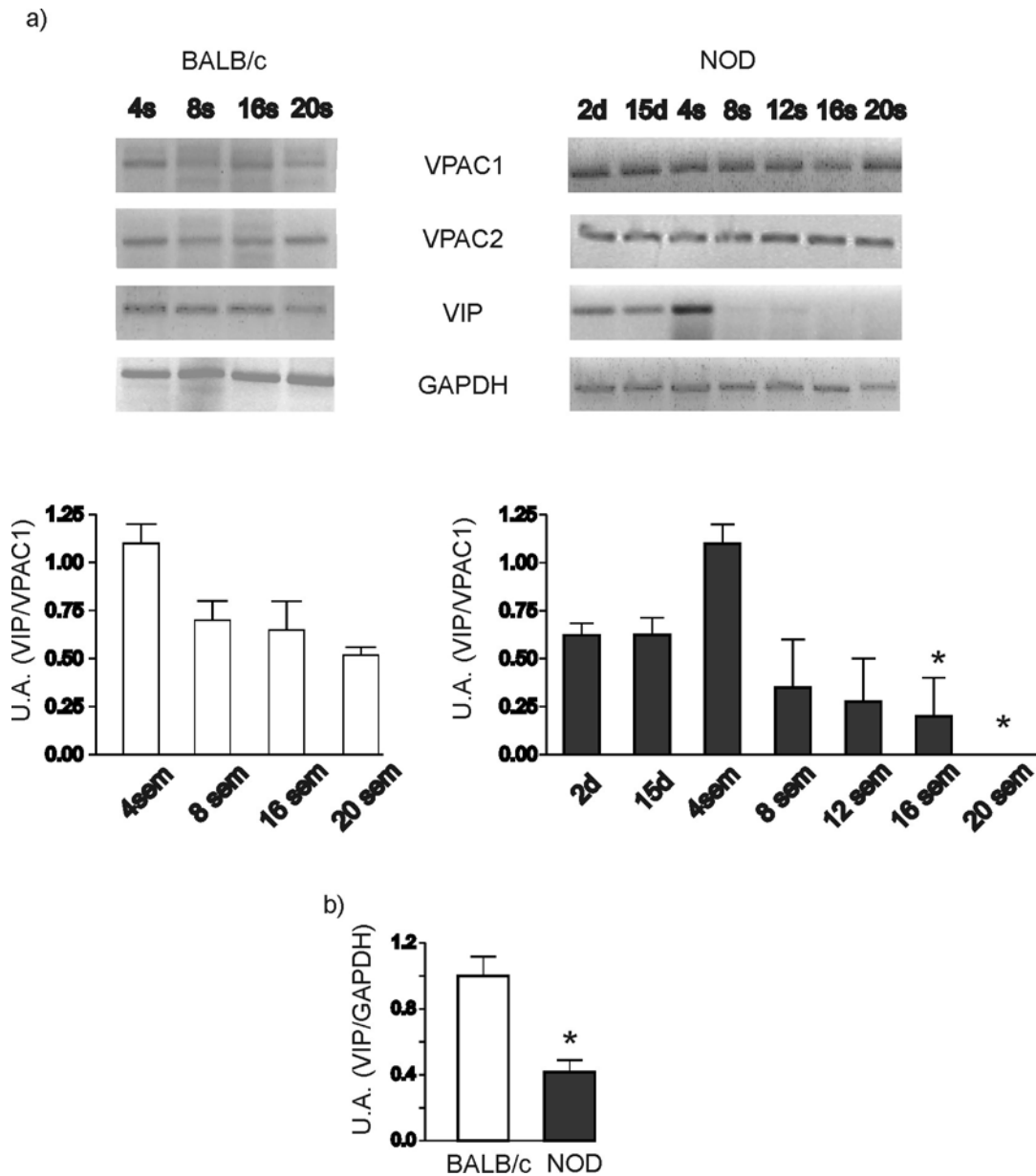
Anexina V/ioduro de propidio para determinar el porcentaje de apoptosis. Como se puede observar en la figura 3 los acinos de glándula submaxilar de ratones NOD de 16 semanas presentan incrementado el porcentaje de células Anexina V positivas en condiciones basales.



**Figura 3. Mayor porcentaje de acinos apoptóticos en glándulas salivales de ratones NOD.** Acinos de glándulas salivales de ratones NOD y controles BALB/c, ambos de 16 semanas de edad, fueron aislados como se describió en Materiales y Métodos. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas por marcación de Anexina V/ioduro de propidio por citometría de flujo. Los *dot plots* mostrados representan los resultados de 3 experimentos similares con distintos ratones.

El VIP es un neuropéptido con funciones pro-secretorias en glándulas exocrinas. También tiene efecto trófico sobre el epitelio de glándulas salivales y es anti-inflamatorio e inmunosupresor en distintos modelos de inflamación crónica y autoinmunidad. Más recientemente propusimos que VIP es capaz de modular procesos apoptóticos en células acinares [36]. Esto nos llevó a preguntarnos si los niveles locales de VIP endógeno podrían variar en las glándulas salivales de ratones NOD y si esa variación podría explicar -en parte- el aumento de acinos apoptóticos y de las señales de apoptosis en las glándulas salivales de estos ratones. Se estudió la expresión de VIP y de sus receptores VPAC1 y VPAC2 en las glándulas salivales por RT-PCR. La figura 4a muestra la cinética de expresión de VIP y sus receptores VPAC1 y VPAC2 en distintas edades, desde el día 2 postnatal hasta 20 semanas de edad. Comparado con ratones controles, las glándulas salivales de ratones NOD presentan la máxima expresión de VIP a las 4 semanas de edad y luego comienza a decrecer. El decaimiento progresivo de la expresión de VIP ocurre sin observarse cambios en la

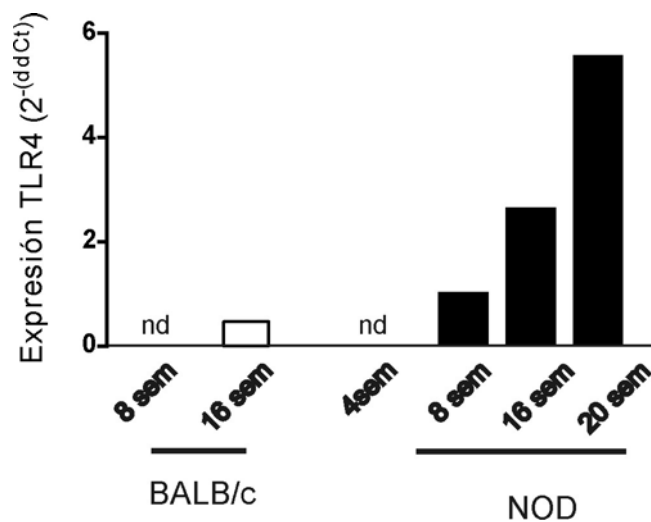
expresión de sus receptores. La reducción de VIP a las 16 semanas de edad fue confirmada por real time PCR (Figura 4b).



**Figura 4. Cinética de la reducción en la expresión de VIP en glándulas salivales de ratones NOD.** Glándulas salivales de ratones NOD y controles de las edades indicadas (2 y 15 días o 4-20 semanas) fueron aisladas como se describió en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de expresión de VIP, VPAC1 y VPAC2 por RT-PCR (a) o por real-time RT-PCR en ratones de 16 semanas (b). Los resultados representan  $X \pm E.S.$  de al menos 4 experimentos con distintos ratones. [\*]  $P < 0,05$  vs. glándulas de 4 semanas en NOD (a) y vs. BALB/c de 16 semanas en (b).

Esta disminución en la expresión de VIP en el tiempo es similar a la cinética de pérdida de la actividad de NOS 1 en las glándulas y a la cinética de disminución en la secreción salival que observamos previamente en el modelo NOD de SS [131].

Por otro lado se ha propuesto que la pérdida de la homeostasis glandular está asociada con una activación intrínseca de las células acinares que produce una predisposición al ataque autoinmune [28]. Se han descrito numerosos marcadores pro-inflamatorios presentes en las glándulas de ratones NOD prediabéticos en los estadios de inicio de la disfunción secretoria y en etapas previas que incluyen a TLR1[132], TLR2[132], TLR4[132], TLR3[132, 133], TLR9[132, 134], MyD88[132]. Asimismo, en trabajos previos demostramos una activación basal de NFkB por translocación de la subunidad p65 al núcleo en acinos de ratones NOD confirmando el perfil pro-inflamatorio del epitelio acinar [135]. En el marco de estas observaciones y de la cinética de disminución de la expresión de VIP en las glándulas, a continuación estudiamos la cinética de expresión de uno de estos marcadores pro-inflamatorios, el TLR4. Encontramos un incremento progresivo en la expresión de TLR4 en glándulas submaxilares solo en los ratones NOD que se superpone con la cinética de disminución en la expresión de VIP (figura 5).



**Figura 5. Cinética de expresión de TLR4 en glándulas salivales de ratones NOD.** Glándulas salivales de ratones NOD y controles de las edades indicadas fueron aisladas como se describió en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de expresión de TLR4 por RT-PCR. Los resultados muestran un experimento representativo de al menos 4 experimentos con distintos ratones. nd: no detectado.

### **Conclusiones parte I:**

Las glándulas salivales de ratones NOD de 16 semanas presentan una estructura alterada con mayor presencia de ductos por campo, núcleos picnóticos compatibles con procesos de apoptosis y un mayor número de acinos apoptóticos aislados a partir de dichas glándulas. A su vez, las glándulas presentan una disminución en la expresión de VIP que acompaña en el tiempo al desarrollo de la disfunción secretoria y se manifiesta con una cinética similar al aumento de la expresión de TLR4.

### PARTE II

#### **Expresión y actividad del sistema VIP/VPAC durante el desarrollo de glándulas salivales**

Estudios recientes han explorado la hipótesis que un desarrollo embrionario y neonatal alterado de las glándulas salivales, tanto en el período de morfogénesis y diferenciación como durante el desarrollo temprano postnatal subyace al desarrollo de la exocrinopatía autoinmune en el ratón adulto [54]. Dichos autores realizaron los experimentos utilizando el modelo NOD y ratones BALB/c como controles.

En base a estos antecedentes y a nuestros resultados sobre la expresión de VIP en el modelo NOD adulto nos interesó estudiar si las glándulas salivales embrionarias de ratones NOD presentan defectos en el sistema VIP/VPAC en estadios prenatales que luego se manifiestan nuevamente en las glándulas submaxilares adultas.

Comúnmente las glándulas embrionarias en día embrionario 13 (E13) son utilizadas en estudios *ex vivo* para analizar procesos de control de la morfogénesis ya que las mismas crecen y se ramifican en un medio libre de suero recapitulando el patrón de ramificación que ocurre *in vivo* [63]. Hasta el momento no está reportado si este cultivo *ex vivo* puede utilizarse para estudiar procesos de diferenciación celular. La diferenciación celular ocurre paralelamente al proceso de morfogénesis, sin embargo, durante los primeros días de desarrollo ocurre principalmente la morfogénesis y pasado el día E15 tiene lugar mayoritariamente la diferenciación celular.

Sobre la base de estas observaciones quisimos estudiar si dicho modelo al día E15 podría utilizarse como modelo de diferenciación. Para esto lo primero que realizamos fueron cultivos durante 24 o 48 h de glándulas submaxilares (SMG) de día E15 provenientes de ratones normales CF1 tomados como controles, y determinamos la expresión de marcadores de diferenciación celular. Como se puede observar en la figura 6, hay un incremento tanto en el tamaño como en el número de lóbulos que presentan las glándulas luego del cultivo realizado tanto por 24 como por 48 horas.

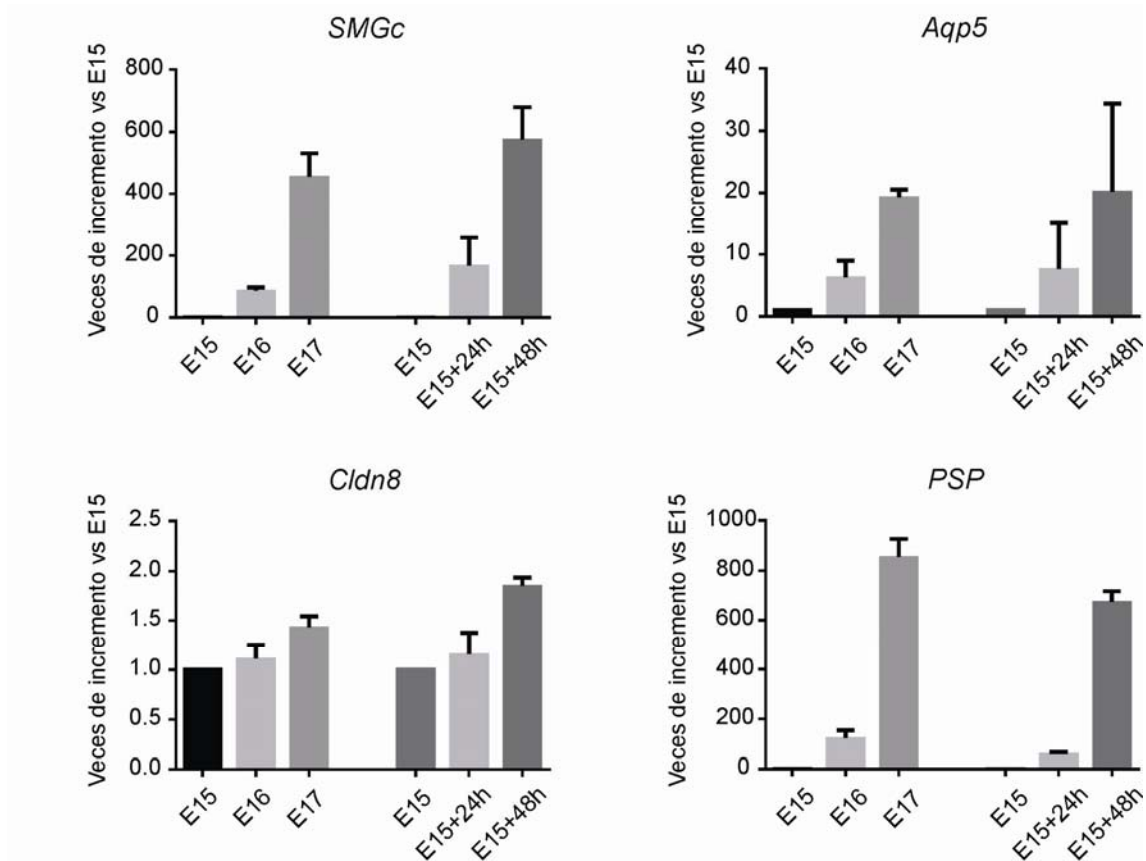


**Figura 6. Cultivo *in vitro* de glándulas submaxilares embrionarias de día E15.** SMG E15 fueron aisladas de ratones controles CF1 como se describió en Materiales y Métodos. Las glándulas fueron cultivadas por 24 o 48 h y se obtuvieron imágenes de las glándulas rodeados por el tejido mesenquimal mediante microscopía de contraste de fase. Imágenes representativas de al menos 10 experimentos independientes tomadas en 40x.

Para estudiar el grado de diferenciación determinamos la expresión de distintos marcadores de diferenciación celular por RT-q PCR. Los marcadores que utilizamos fueron los siguientes:

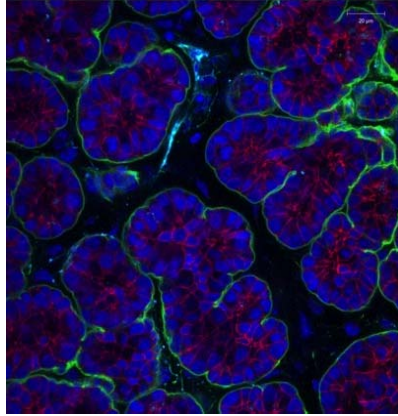
- *PSP* es la proteína secretoria de parótida que transitoriamente se expresa en la población progenitora secretoria en SMG durante la diferenciación ausente en células acinares maduras.
- *Cldn8* es una proteína transmembrana presente en las uniones estrechas. En SMG en desarrollo su expresión se restringe a los ductos y túbulos terminales.
- *Aqp5*, marcador temprano de células proacinares en SMG en desarrollo cuya expresión se mantiene en células acinares maduras y en menores niveles en células ductales intercaladas proximales a las células acinares.
- *SMGc* que se expresa en células acinares.

Como se puede observar en la figura 7, durante el cultivo *in vitro* se induce la expresión de los marcadores de diferenciación de manera similar a lo que ocurre *in vivo*.



**Figura 7. Cinética de expresión de marcadores de diferenciación en glándulas salivales embrionarias.** SMG E15, E16 y E17 fueron aisladas de ratones controles como se describió en Materiales y Métodos. SMG E15 fueron cultivadas durante 24 o 48 h como se describe en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de expresión de *PSP*, *Cldn8*, *Aqp5*, *SMGc* por RT-qPCR. Los resultados se expresan como  $X \pm E.S.$  de al menos 4 experimentos.

Para corroborar si durante estos cultivos las células acinares logran una organización y polarización basal-apical adecuada para su funcionalidad realizamos marcaciones de E-caderina (rojo), Perlecan (verde), Tubulina  $\beta 3$  (celeste) y DAPI (azul) (Figura 8). Se puede ver que luego de 24 h de cultivo las glándulas presentan una organización celular simulando la estructura de un acino. Se observa que las estructuras acinares están rodeadas por una matriz extracelular, los núcleos de las células que lo conforman presentan una localización basal y se distingue la formación del lumen.



**Figura 8. Inmunofluorescencia de SMG E15 luego de 24 h de cultivo.** SMG E15 fueron aisladas de ratones controles CF1 y cultivadas por 24 h antes de ser fijadas y marcadas para inmunofluorescencia como se indica en Materiales y Métodos. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes tomadas en 400x.

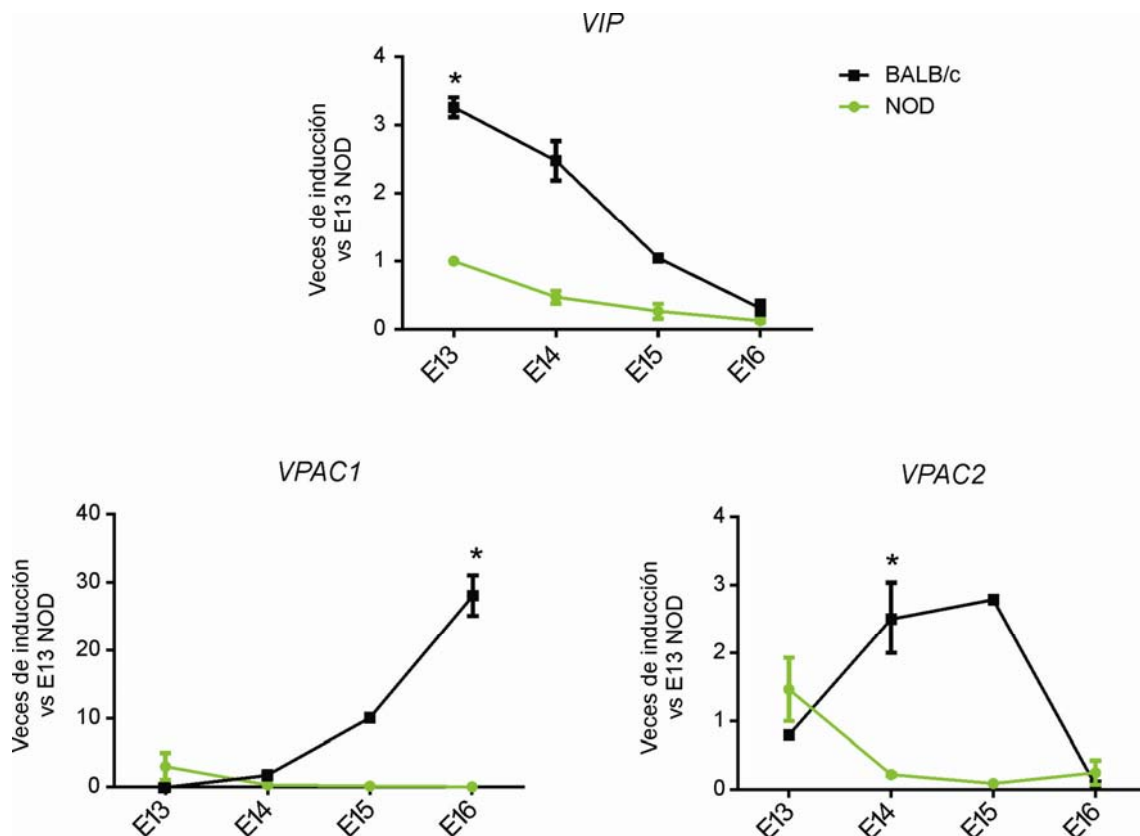
Por lo tanto corroboramos que las glándulas submaxilares embrionarias recapitulan tanto procesos de morfogénesis [136] como de diferenciación.

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que una morfogénesis embrionaria y neonatal alterada pueden favorecer el desarrollo de la exocrinopatía autoinmune en el adulto, por esto nos interesó estudiar si las glándulas salivales embrionarias entre los días embrionarios 13 y 16 de ratones NOD presentan alguno de los defectos en la expresión de VIP y sus receptores observados en las glándulas submaxilares de ratones NOD adultos.

Para esto realizamos mediciones a nivel del RNA mensajero de VIP y del receptor VPAC1 por RT-qPCR. De acuerdo a lo reportado por *Salivary Gland Molecular Anatomy Project*, durante el desarrollo desde el día E13 al 16 hay una disminución de la expresión de VIP acompañado de un incremento en la expresión de VPAC1. No hay datos de la expresión de VPAC2. Estos datos fueron corroborados por RT-qPCR en la cepa control BALB/c (Figura 9). Por su parte, en glándulas embrionarias de ratones NOD observamos que el patrón de expresión de VIP es el mismo que el reportado anteriormente en controles, sin embargo los niveles relativos de expresión respecto a la cepa control se encuentran disminuidos. Estos resultados son consistentes con la reducida expresión de VIP que describimos en ratones adultos que manifiestan disfunción secretoria y respuesta autoinmune. Por otro lado, en glándulas de ratones NOD en el período embrionario, el patrón de expresión del receptor VPAC1 difiere de



los animales control (Figura 9). Mientras que en los controles BALB/c hay un aumento de la expresión del receptor VPAC1 del día E13 al día E16, en los ratones NOD esta cinética no se manifiesta. Al estudiar la expresión del receptor VPAC2 encontramos que también tiene su cinética de expresión alterada respecto a las glándulas controles.

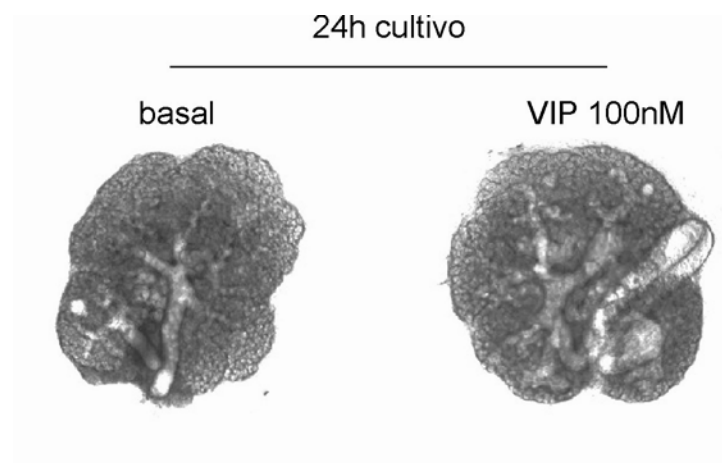


**Figura 9. Expresión del sistema VIP/VPAC en glándulas salivales embrionarias E13- E16.** SMG E13- E16 fueron aislados de ratones BALB/c y NOD como se describió en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de expresión de VIP, VPAC1 y VPAC2 por RT-qPCR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos. \*  $P < 0,05$  vs. glándulas NOD del mismo día embrionario.

Recientemente se ha reportado que el VIP secretado por la innervación ganglionar promueve el crecimiento ductal llevando a la formación de un lumen continuo y facilitando la expansión luminal a través de la vía de señalización dependiente de AMPc/PKA [65]. Estudios previos han demostrado además que las glándulas embrionarias de ratones NOD presentan una formación aberrante del ducto y defectos en la polarización basal-apical en las células ductales secundarias que se evidencian

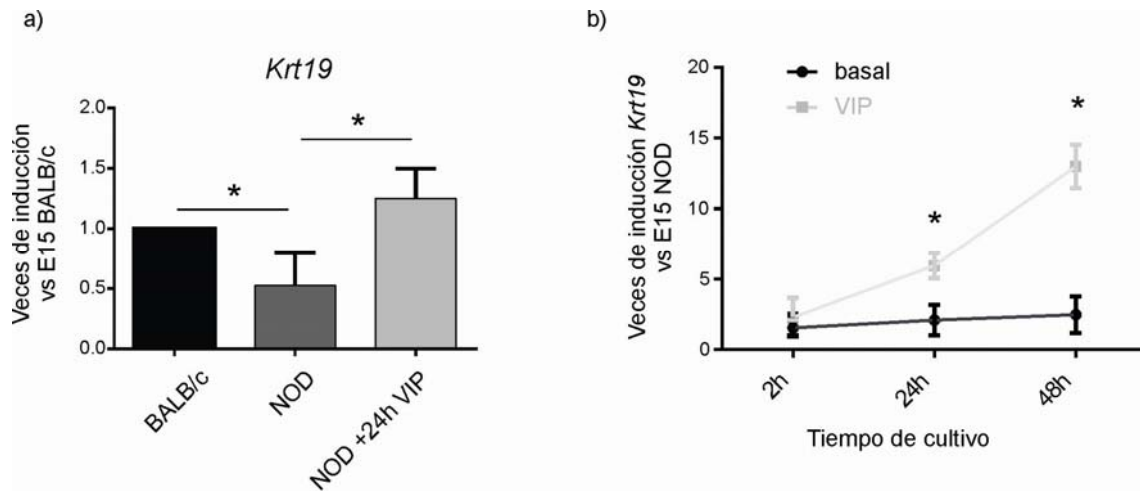
con mayor claridad a partir del día E15 [136]. Sobre la base que estos defectos estructurales se asocian con una pérdida de la homeostasis tisular en las glándulas de ratones NOD adultos, y teniendo en cuenta los resultados anteriores en los que las glándulas de los ratones NOD en el período embrionario presentan una diferente cinética de la expresión VPAC1 y VPAC2 y menores niveles de expresión del VIP, hipotetizamos que el tratamiento de las glándulas embrionarias con VIP *in vitro* podría contribuir a la formación adecuada del ducto en ratones NOD. Para esto realizamos cultivos de glándulas submaxilares E15 de ratones NOD en presencia o no de VIP 100 nM.

A nivel estructural podemos ver que, tal como se describió para ratones normales, en las glándulas E15 de ratones NOD el tratamiento con VIP induce un incremento en el tamaño del ducto principal y los ductos secundarios (Figura 10).



**Figura 10. VIP favorece la formación del ducto en cultivos de glándulas submaxilares de día E15 de ratones NOD.** SMG fueron aisladas de embriones de ratones NOD en día E15 como se describió en Materiales y Métodos. Las glándulas fueron cultivadas por 24 h en presencia o ausencia de VIP 100 nM y se obtuvieron imágenes de ‘buds’ epiteliales rodeados por el tejido mesenquimal mediante microscopía de contraste de fase. 40x. Representativo de 3 experimentos similares.

Dado el incremento en la formación de ductos observado decidimos determinar la expresión de citoqueratina 19, marcador de células ductales. Observamos una cinética de incremento de dicho marcador ductal (Figura 11b) a niveles similares a los de las SMG controles (Figura 11a), consistente con el incremento a nivel ductal que se observa estructuralmente.



**Figura 11. Expresión de citoqueratina 19 en glándulas salivales embrionarias E15.** SMG E15 fueron aisladas de ratones NOD y BALB/c como se describió en Materiales y Métodos. a) Se analizó la expresión de citoqueratina 19 (Krt 19) por RT-qPCR en glándulas en condiciones basales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos. \* $P < 0,05$ . b) Las glándulas NOD fueron cultivadas por 2, 24 o 48 h en presencia o ausencia de VIP 100 nM. Se determinaron los niveles de expresión de citoqueratina 19 por RT-qPCR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. mismo tiempo de cultivo en condición basal.

### Conclusiones parte II:

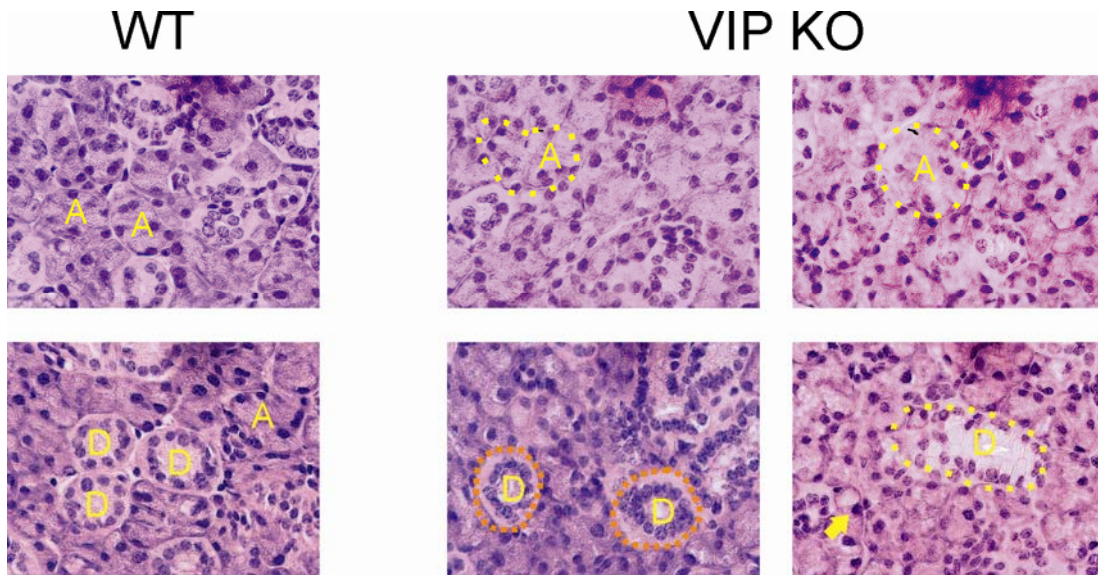
Los resultados indican que en los cultivos de glándulas salivales embrionarias, utilizados para estudiar procesos de morfogénesis y diferenciación celular, las glándulas salivales en desarrollo prenatal de ratones NOD ya presentan entre los días E13-E16 un patrón alterado de expresión del sistema VIP/VPAC. Por otro lado, el tratamiento *in vitro* de las mismas con VIP favorece la formación del ducto e induce un incremento en la expresión de marcadores del tipo ductal, a niveles similares a las glándulas control.

### PARTE III

#### Caracterización funcional e histológica de las glándulas salivales de ratones deficientes en VIP

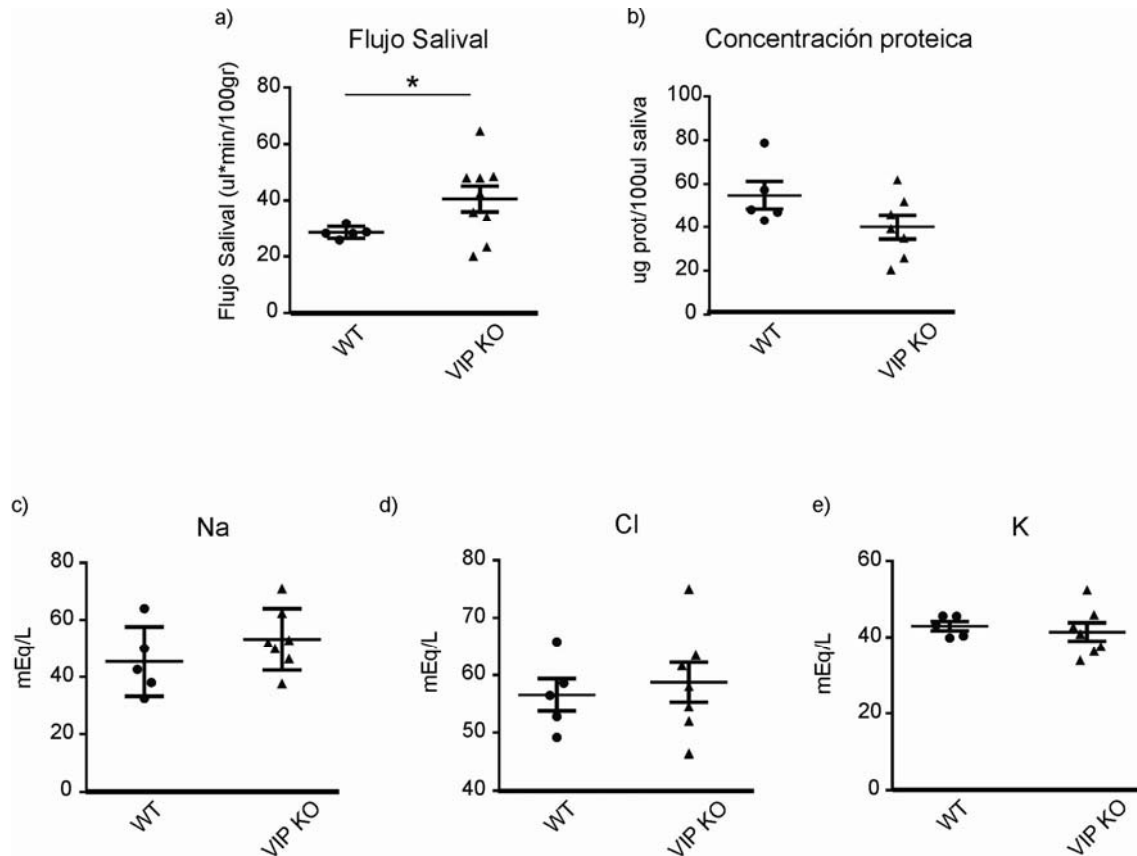
Basados en que los ratones NOD adultos presentan una disminución de la expresión de VIP que acompaña a la progresiva reducción de la función secretoria; que en las glándulas embrionarias de ratones NOD se detectan alteraciones en el patrón de expresión del VIP y sus receptores; y que el tratamiento de glándulas embrionarias con VIP indujo un incremento en las células ductales, quisimos estudiar qué sucede en las glándulas salivales en ratones deficientes en la expresión del neuropéptido desde la etapa embrionaria. Así, a continuación estudiamos la histología glandular y la función secretoria en ratones *knock-out* en VIP (VIP KO) comparado con ratones normales de la cepa C57/B6 (WT).

Como se puede observar en la figura 12 los ratones WT presentan una arquitectura conservada de la glándula salival. Los acinos presentan núcleos esféricos ubicados en la zona basal y se pueden distinguir claramente los límites intercelulares (Figura 12 WT). Se encontraron focos de infiltración aislados asociados a conductos. Al estudiar las glándulas de los ratones deficientes en VIP se vio que presentan alteraciones en la citoarquitectura del parénquima glandular. La estructura de los acinos no está claramente definida. El epitelio que los recubre presenta bordes difusos y es irregular (Figura 12 KO acinos marcados con puntillado amarillo). Los mismos se encuentran fusionados entre sí por lo que se pierden los límites intercelulares. Además los citoplasmas de las células acinares aparecen difusos con aspecto espumoso/grumoso. Los ductos tampoco están bien definidos (Figura 12 KO ductos marcados con puntillado amarillo) y se encuentran rodeados de una matriz (Figura 12 KO ductos marcados con puntillado anaranjado). También se observan células de gran tamaño sin definir (Figura 12 KO Flecha). Por su gran tamaño se descarta que sean células inmunes infiltrantes.



**Figura 12: Estructura alterada del parénquima glandular en ratones C57/B6 deficientes en VIP.** Glándulas salivales de ratones C57/B6 normales (WT) o deficientes en VIP (VIP KO) fueron extraídas y fijadas en paraformaldehído 4% para luego realizar una tinción de hematoxilina-eosina de los cortes parafinados como se indica en Materiales y Métodos. Imágenes representativas de al menos 10 ratones de cada grupo tomadas en 400X. A: Acinos, D: ductos, Flechas indican células aisladas. Líneas punteadas amarillas o anaranjadas indican otras alteraciones (ver texto).

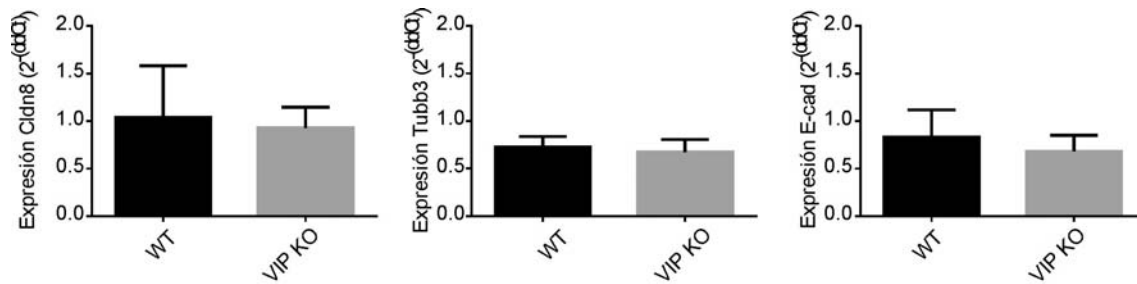
Luego realizamos ensayos *in vivo* de flujo salival y liberación de proteínas totales en saliva de ratones C57/B6 WT y VIP KO. Se estimuló la secreción con una inyección intraperitoneal del agonista muscarínico pilocarpina dado que, como se mencionó previamente, los roedores no presentan secreción basal de saliva. Además medimos la concentración de electrolitos en saliva ya que las células acinares producen un fluido isotónico con osmolaridad similar al plasma que es modificado por los ductos produciendo una saliva hipotónica depletada de Na y Cl.



**Figura 13. Alteraciones en la función secretoria de ratones deficientes en VIP.** Ratones C57/B6 WT y deficientes en VIP (VIP KO) ayunados fueron inyectados con pilocarpina por vía i.p.. La saliva fue recolectada durante los siguientes 10 minutos y se determinó (a) el flujo salival (b) las proteínas totales en la saliva recolectada y (c) la concentración de Na, K y Cl como se describe en Materiales y Métodos. Los valores indican  $X \pm E.S.$  del número de determinaciones graficado en cada caso. \*  $P < 0,05$

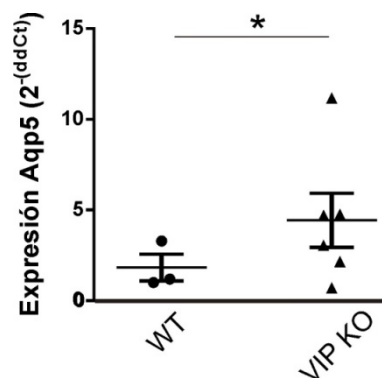
En contraste con los ratones control, los ratones deficientes en VIP presentan un estado de hipersecreción asociado a una menor síntesis de proteínas (Figura 13). Sin embargo, no observamos diferencias en la concentración de electrolitos en la saliva (Figura 13).

En vista de estas diferencias tanto a nivel estructural como funcional quisimos estudiar si existen diferencias en la expresión de distintos marcadores característicos de las poblaciones ductales (*Cldn-8*), neuronales (*Tubb3*) y epiteliales acinares (*E-cad*). La figura 14 muestra que las glándulas de los ratones VIP KO no difieren en los niveles de expresión de los marcadores específicos de poblaciones celulares de glándulas salivales comparado con ratones control.



**Figura 14. Similar expresión de distintos marcadores de subpoblaciones glandulares específicas en ratones WT y deficientes en VIP.** Glándulas salivales de ratones WT o deficientes en VIP fueron aisladas como se describió en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de expresión de *Cldn8*, *Tubb3* y *E-cad* por RT-qPCR. Los resultados representan  $X \pm E.S.$  de al menos 4 experimentos con distintos ratones.

Dado que la secreción acuosa por las glándulas salivales requiere una adecuada expresión de la AQP5 en el epitelio glandular y teniendo en cuenta las diferencias en el patrón de secreción salival en los ratones deficientes en VIP, el siguiente paso fue estudiar la expresión de *Aqp5* a nivel de mensajero medido por RT-qPCR. Como se puede observar en la figura 15 los ratones deficientes en VIP tienen incrementada la expresión del mensajero de la acuaporina 5.



**Figura 15. Aumentada expresión de acuaporina 5 en glándulas salivales.** Glándulas salivales de ratones WT o deficientes en VIP (VIP KO) fueron aisladas como se describió en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de expresión de *Aqp5* por RT-qPCR. Los resultados representan  $X \pm E.S.$  de los experimentos indicados en el gráfico con distintos ratones. [\*]  $P < 0,05$ .

### **Conclusiones parte III**

Los resultados indican que los ratones deficientes en VIP presentan diferencias en la estructura y función glandular, presentando alteraciones del parénquima glandular y características funcionales particulares, con un patrón alterado de secreción salival, una tendencia a la disminución de la secreción proteica y un aumento en la expresión de Acuaporina 5.



### PARTE IV

#### **Fagocitosis de células acinares apoptóticas por macrófagos de ratones NOD: Efecto inmunomodulador de VIP**

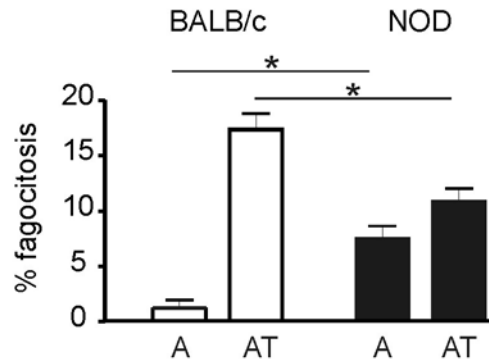
Durante la pérdida de la homeostasis glandular en el síndrome de Sjögren se describió un incremento del número de células apoptóticas en las biopsias de glándulas. El paso final del programa apoptótico es la eliminación de estos cuerpos apoptóticos por células fagocíticas en un microambiente anti-inflamatorio que evita una respuesta deletérea para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Teniendo en cuenta que los macrófagos peritoneales de ratones NOD presentan una aumentada producción de citoquinas pro-inflamatorias tanto en condiciones basales como frente a un estímulo inflamatorio como el LPS [137], nos interesó estudiar la función fagocítica de los macrófagos en la eliminación de cuerpos apoptóticos acinares en ratones NOD pre-diabéticos y controles BALB/c y el papel inmunomodulador del VIP en este proceso.

En primer lugar analizamos el perfil fenotípico de los macrófagos peritoneales de ratones NOD y BALB/c en condiciones basales, donde corroboramos que los macrófagos NOD presentan un perfil de expresión de mediadores compatible con el fenotipo inflamatorio o M1, con altos niveles de TNF- $\alpha$ , IL-12, nitritos, niveles reducidos de PGE2 y sin diferencias significativas en los niveles de IL-10 (Figura 16).



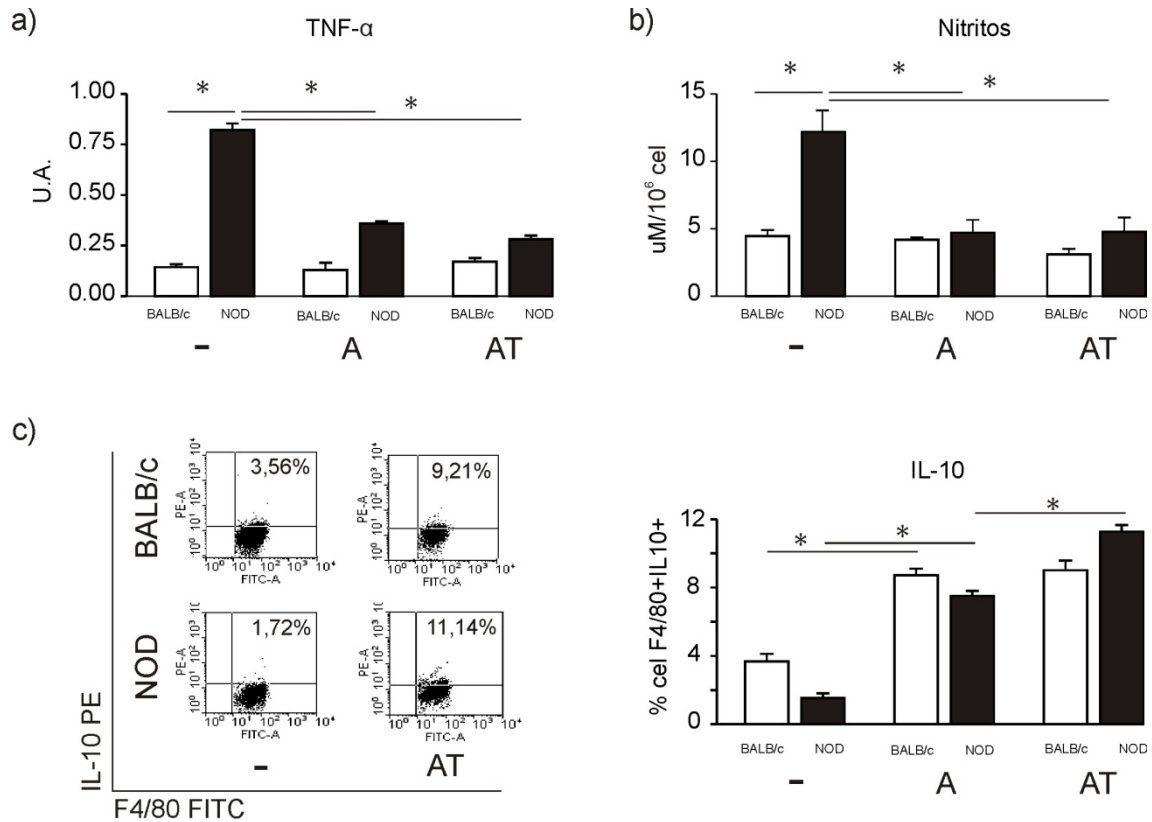
**Figura 16. Perfil de activación de macrófagos de ratones NOD compatible con un fenotipo inflamatorio.** Macrófagos peritoneales NOD Y BALB/c fueron aislados como se describió en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles de secreción de nitritos por Griess, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  por ELISA y PGE2 por radioinmunoensayo como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados representan  $X \pm \text{E.S.}$  de al menos 5 experimentos con distintos ratones. \*  $P < 0,05$  vs. BALB/c.

Para estudiar la función fagocítica realizamos co-cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneales con células acinares apoptóticas. Al analizar el índice fagocítico observamos que los macrófagos peritoneales de ratones NOD presentan disminuida su capacidad fagocítica respecto a los controles tanto durante la fagocitosis de células acinares apoptóticas en condiciones de aislamiento estándar (A) como las que fueron previamente tratadas con TNF- $\alpha$  10 ng/ml para inducir mayor apoptosis *in vitro* (AT) (Figura 17). En el caso de los ratones BALB/c, la fagocitosis solo se realizó de acinos BALB/c tratados con TNF- $\alpha$  20ng/ml, ya que los mismos no presentan apoptosis en condiciones basales como se mostró previamente.



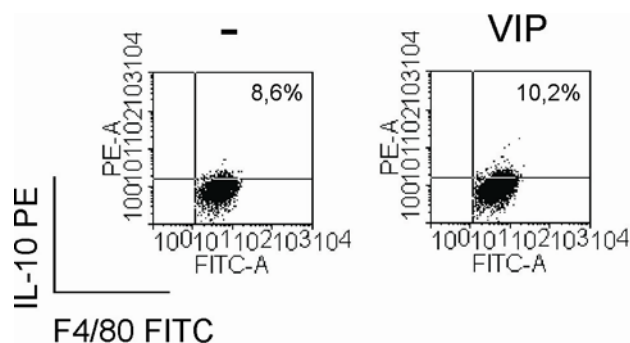
**Figura 17. Menor fagocitosis de células acinares apoptóticas de glándula submaxilar por macrófagos NOD.** Macrófagos peritoneales y acinos de glándula submaxilar fueron aislados como se describió en Materiales y Métodos. Las células acinares fueron previamente inducidas a apoptosis con TNF- $\alpha$  (AT) o no (A) según se indica, empleando 10 ng/ml para los acinos NOD o 20 ng/ml para los acinos BALB/c. Macrófagos cultivados en placas de 24 pocillos fueron incubados con células acinares apoptóticas durante 90 minutos. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol y se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. Los preparados se observaron al microscopio de campo claro y se calculó el porcentaje de fagocitosis como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos. \*  $P < 0,05$ .

A continuación, analizamos el perfil fenotípico de los macrófagos de ratones NOD luego de la fagocitosis con el fin de evaluar si mantenían o no el perfil inflamatorio observado antes de la fagocitosis. La figura 18 muestra que el perfil inflamatorio de los macrófagos peritoneales de ratones NOD es modulado a un perfil regulatorio cuando los macrófagos son incubados con células acinares apoptóticas de glándula submaxilar. Así, se observa una reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  y nitritos a valores similares a los de macrófagos de ratones controles y un aumento en el porcentaje de macrófagos productores de IL-10.



**Figura 18. Perfil de activación alternativo de los macrófagos NOD estimulados con células apoptóticas.** Macrófagos peritoneales y acinos de glándula submaxilar fueron aislados como se describió en Materiales y Métodos. Luego de 90 minutos de incubación de los macrófagos con las células acinares (A) inducidas o no a apoptosis con TNF-α (AT) se lavaron los macrófagos y se dejaron en cultivo por 24 h. Se determinó la expresión de TNF-α por RT-PCR, Nitritos por Griess, IL-10 por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media ± E.S. de al menos 4 experimentos. \* P<0,05

El VIP es capaz de estabilizar este fenotipo inmunosupresor en los macrófagos ya que el tratamiento induce un incremento de IL-10 aun mayor y los niveles de nitritos fueron indetectables (no mostrado).



**Figura 19. VIP estabiliza el perfil de activación alternativo de los macrófagos NOD estimulados con células**

**apoptóticas.** Macrófagos peritoneales y acinos de glándula submaxilar fueron aislados como se describió en Materiales y Métodos. Como en la figura 18, luego de 90 minutos en ausencia o presencia de VIP 100nM se lavaron las células y se dejaron en cultivo por 24 h. Se determinó la expresión de IL-10 por citometría de flujo. El *dot plot* es representativo de 4 experimentos independientes.

### **Conclusiones parte IV**

La fagocitosis de células acinares apoptóticas por macrófagos NOD se encuentra alterada, sin embargo los macrófagos peritoneales adquieren un perfil compatible con un fenotípico de activación alternativa con producción de IL-10 y el VIP favorece dicho perfil.

## CAPITULO 2

### PARTE I

#### **Expresión del sistema VIP/VPAC y efectos del VIP en monocitos de pacientes con SSp**

Los resultados obtenidos en cuanto a alteraciones en la estructura y función de las glándulas salivales asociados a diferencias en el sistema VIP/VPAC en ratones NOD adultos, aceptados en la literatura como modelo de SS, como también las diferencias observadas en los otros dos modelos propuestos en esta tesis -los ratones NOD durante el desarrollo embrionario y los ratones deficientes en la expresión de VIP-, apoyan la hipótesis que el sistema VIP/VPAC participa en el mantenimiento de la estructura y función glandular y, como consecuencia, posiblemente en el mantenimiento de la homeostasis en las glándulas. Más aún, el déficit en la fagocitosis de acinos apoptóticos por macrófagos peritoneales observada en los ratones NOD adultos apoya la hipótesis que el exceso de apoptosis de acinos en las glándulas no culmina con una adecuada remoción de cuerpos apoptóticos.

Por otro lado, se ha descrito en biopsias de glándulas labiales de pacientes con SSp una menor inervación por fibras positivas para VIP y una estructura alterada del parénquima glandular con apoptosis aberrante de acinos y aumento de marcadores pro-inflamatorios. Sin embargo, como se ha comentado, no hay correlación entre el déficit funcional y el moderado grado de infiltración mononuclear de las glándulas que incluso puede estar ausente.

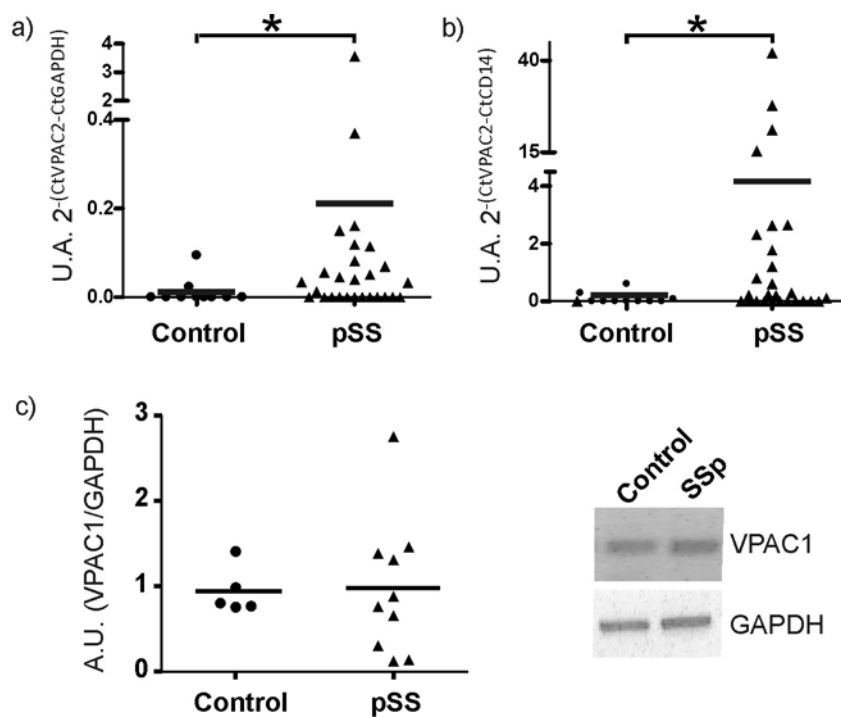
Sobre la base de estas observaciones realizadas por otros autores en pacientes, y los resultados presentados aquí trabajando con los modelos murinos, hipotetizamos que en los pacientes con SSp la fagocitosis de células epiteliales del parénquima glandular por monocitos/macrófagos está alterada favoreciendo una respuesta pro-inflamatoria que podría ser modulada por VIP.

Para probarlo, diseñamos experimentos *in vitro* con células de epitelio de glándula submaxilar humana (línea celular HSG) y muestras de monocitos de sangre periférica de pacientes con síndrome de Sjögren primario, analizadas individualmente. Mediante distintos sistemas de co-cultivo, evaluamos procesos como proliferación, apoptosis y

diferenciación de células epiteliales, como también la expresión de marcadores de perfil de las células fagocíticas, su respuesta a estímulos pro-inflamatorios y fagocitosis de células epiteliales apoptóticas en presencia o no de VIP.

En primer lugar, determinamos la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 en monocitos de pacientes con Síndrome de Sjögren primario. Se utilizaron como control interno de carga los genes GAPDH como el marcador específico de monocitos CD14.

Como se puede observar en la figura 20, los monocitos de pacientes con SSp presentan un aumento en la expresión del receptor VPAC2, tanto utilizando como control GAPDH como CD14. En contraste, el receptor VPAC1 se encuentra expresado en niveles similares a los que presentan los monocitos de voluntarios sanos tomados como control. No pudimos detectar la expresión de VIP en monocitos de SSp ni controles.

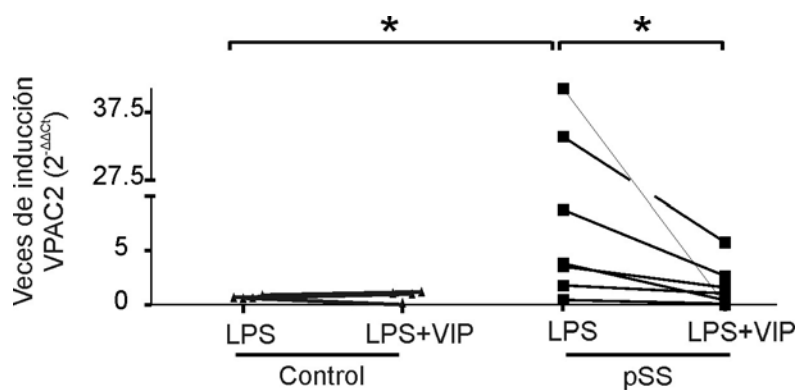


**Figura 20. Aumento en la expresión de VPAC2 sin cambios en VPAC1 en monocitos de pacientes con SSp.** Monocitos de pacientes con SSp o controles fueron aislados como en Materiales y Métodos. Se analizó la expresión de VPAC2 por RT-qPCR usando (a) GAPDH o (b) CD14 como gen característico de monocitos. Los valores representan la expresión relativa a GAPDH ( $2^{-(CtVPAC2-CtGAPDH)} \times 1000$ ) o CD14 ( $2^{-(CtVPAC2-CtCD14)} \times 1000$ ) de cada uno de los pacientes y controles que se muestran y se grafica la media de esos casos. \*  $P < 0,05$ . c) la expresión de VPAC1 se determinó por RT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran los valores obtenidos para en número de pacientes con SSp o voluntarios sanos que se indican en el gráfico y un gel representativo.

Se ha demostrado que el receptor VPAC2 es regulado positivamente tanto en macrófagos peritoneales de ratón como en la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7 por estimulación a través de sus receptores TLR [138, 139].

Para investigar si en monocitos humanos VPAC2 también podía ser inducido a través del estímulo con LPS vía TLR4, incubamos monocitos de pacientes con SSp y controles con 1 µg/ml LPS por 24 h. Como se puede observar en la figura 21, LPS aumenta la expresión de VPAC2 en monocitos de pacientes con SSp. Por el contrario, la expresión del receptor VPAC2, ausente en monocitos de donadores sanos, no fue inducida por LPS en estas condiciones experimentales. LPS no moduló la expresión de VPAC1 (no mostrado).

Luego nos preguntamos si el incremento en la expresión de VPAC2 por LPS podía ser modulado por VIP. Para probarlo, incubamos a las células con LPS y VIP 100 nM. La figura 21 muestra que el tratamiento con VIP es capaz de inhibir la inducción provocada por el LPS indicando la funcionalidad de sus receptores.



**Figura 21. LPS induce la expresión de VPAC2 en monocitos de pacientes con SSp y VIP inhibe el efecto.** Monocitos de pacientes con SSp o controles fueron aislados como se indica en Materiales y Métodos. Se analizó la expresión de VPAC2 por RT-qPCR luego de la incubación durante 24h con 1µg/ml LPS en presencia o ausencia de VIP 100nM. \* P<0,05.

### Conclusiones parte I

Los resultados indican que los monocitos de pacientes con síndrome de Sjögren primario presentan mayor expresión de VPAC2, ausente en monocitos de individuos controles. La expresión de VPAC2 es modulada por LPS y VIP inhibe este efecto.

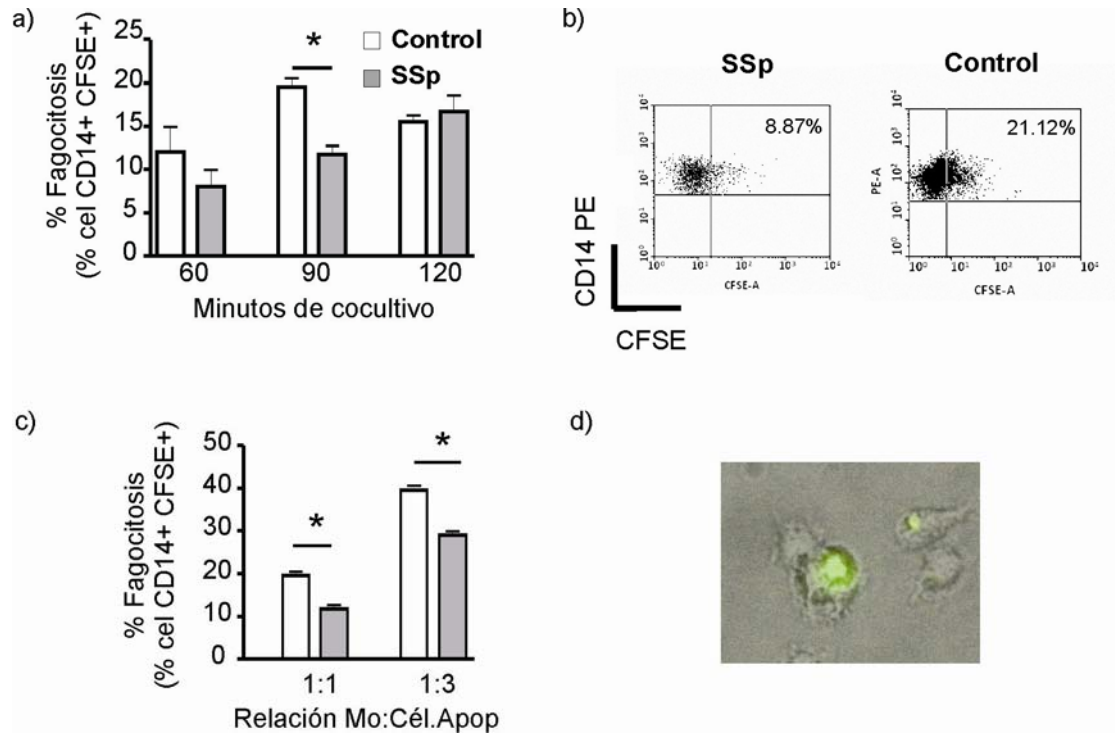


### PARTE II

#### **Fagocitosis de células epiteliales apoptóticas por monocitos de pacientes con síndrome de Sjögren primario: Efecto inmunomodulador de VIP**

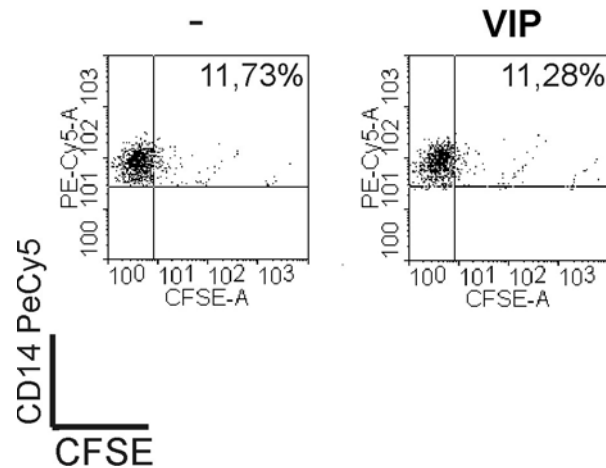
Considerando que la remoción de células apoptóticas por fagocitos profesionales es esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular y con los datos previos obtenidos en el modelo NOD, a continuación nos interesó estudiar la fagocitosis de células de glándula submaxilar (HSG) apoptóticas por monocitos tanto de pacientes con SSp como de voluntarios sanos como control. Para esto realizamos co-cultivos de monocitos con células epiteliales HSG previamente inducidas a apoptosis con staurosporina 50 nM.

Los cultivos los realizamos durante 60, 90 y 120 minutos en relación 1:1 monocito: célula apoptótica. Como se ve en la figura 22a, encontramos que los monocitos de pacientes con SSp luego de 90 minutos de incubación con células apoptóticas presentan un menor porcentaje de fagocitosis respecto a los controles. La figura 22b muestra los resultados obtenidos con células de un paciente con SSp y un sujeto control en la marcación por citometría de flujo de células CD14+CFSE+. Esta diferencia en el porcentaje de fagocitosis entre monocitos de pacientes y controles se mantiene al aumentar 3 veces el número de células apoptóticas incubadas con los monocitos (Figura 22c). En la figura 22d se puede ver una microfotografía de un monocito fagocitando una célula epitelial apoptótica.



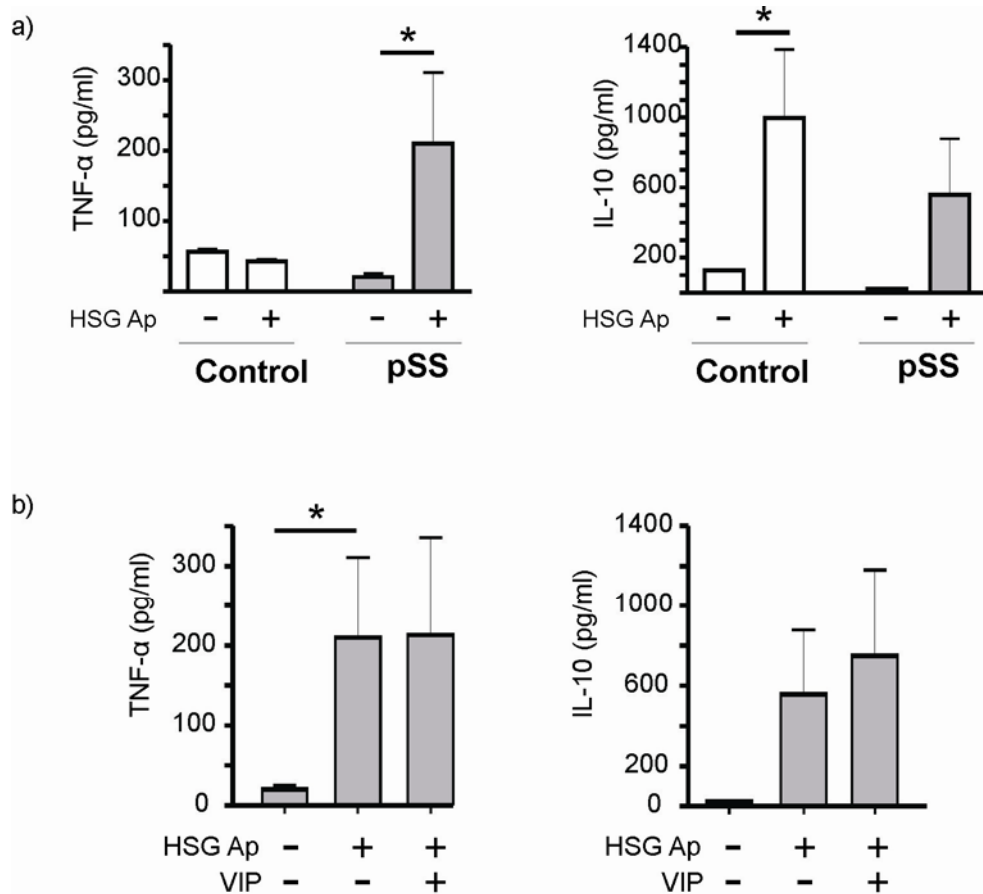
**Figura 22. Menor fagocitosis de células HSG apoptóticas por monocitos de pacientes con SSp.** Monocitos de pSS y controles fueron incubados durante los tiempos indicados con células epiteliales de glándula submaxilar (línea celular HSG) previamente inducidas a apoptosis con staurosporina 50nM durante 16 h y marcadas con la sonda fluorescente CFSE. Luego de los tiempos indicados las células fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD14-PE como se indica en Materiales y Métodos y analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CD14+CFSE+. Los resultados se indican como la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos. \*  $P < 0,05$  vs. correspondiente control. a) Los cultivos se realizaron en una relación 1:1 monocito:célula apoptótica b) *Dot plot* representativo. c) Los cultivos se realizaron durante 90 minutos en relación 1:1 o 1:3 monocito:célula apoptótica. d) foto representativa de un monocito fagocitando una célula apoptótica marcada con CFSE.

Luego nos interesó estudiar si el VIP era capaz de modificar la fagocitosis de células apoptóticas por monocitos de pacientes con SSp. Para esto realizamos los ensayos en presencia de 100 nM de VIP. Como se puede observar en el ensayo representativo de la figura 23, VIP no modificó el porcentaje de fagocitosis.



**Figura 23. VIP no modula el porcentaje de fagocitosis de células HSG apoptóticas por monocitos de pacientes con SSp.** Monocitos de SSp y controles fueron incubados en presencia o ausencia de VIP 100 nM durante 90 min con células epiteliales de glándula submaxilar previamente inducidas a apoptosis con staurosporina 50nM durante 16 h y marcadas con la sonda fluorescente CFSE. Luego de 90 minutos de cultivo las células fueron lavadas y marcadas con anticuerpo anti-CD14-PE como en Materiales y Métodos y analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células CD14+CFSE+. Se muestra un ensayo representativo de 4 experimentos independientes.

Para lograr un efectivo control de la homeostasis tisular, además de eliminar de forma rápida las células apoptóticas, es necesario que este proceso ocurra en un microambiente inmunosupresor que favorezca mecanismos de tolerancia inmunológica. Estudiamos entonces el perfil de citoquinas expresado por los monocitos luego del proceso de fagocitosis. Como era esperable para las células CD14+ provenientes de individuos controles, la fagocitosis indujo un aumento en la secreción de IL-10 con bajos niveles de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ , ambas medidas por ELISA. En contraste, los monocitos de pacientes con SSp incrementaron la producción de TNF- $\alpha$  sin inducir un aumento significativo en la producción de IL-10 (Figura 24a).

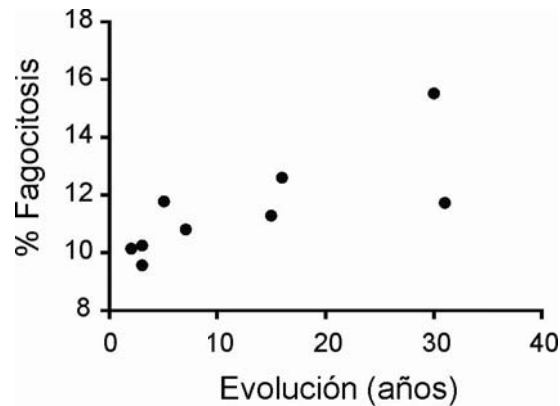


**Figura 24. Menor síntesis de IL-10 y mayor de TNF- $\alpha$  en monocitos de SSp frente a células apoptóticas y déficit en el control de este perfil por VIP.** a) Monocitos de pSS y controles fueron incubados durante 90 minutos con células epiteliales de glándula submaxilar previamente inducidas a apoptosis con staurosporina 50nM durante 16h. Pasado dicho tiempo los monocitos fueron lavados y se dejaron durante 24 h en cultivo. Se midió la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-10 por ELISA como se describe en Materiales y Métodos. b) En los mismos ensayos se evaluó el efecto de 100nM de VIP. Los valores representan la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos. \* P<0,05.

Dado el efecto anti-inflamatorio del VIP nos preguntamos si éste era capaz de revertir el perfil pro-inflamatorio predominante de los monocitos de pacientes con SSp luego del proceso fagocítico. La Figura 24 b muestran que la inclusión de VIP 100 nM en los ensayos no modificó la adquisición de un perfil pro-inflamatorio de los monocitos de pacientes con SSp ya que no redujo los niveles de TNF- $\alpha$  ni aumentó significativamente los de IL-10.

Finalmente, en vista de la aumentada expresión de VPAC2 en monocitos de pacientes con SSp y la menor capacidad fagocítica de estos monocitos, nos interesó analizar la posible asociación entre estas observaciones experimentales y algunos parámetros

clínicos e información relevante de los pacientes. Interesantemente, como se ve en la figura 25, en los monocitos de pacientes con SSp se observa una correlación positiva entre el porcentaje de fagocitosis de células apoptóticas HSG y los años de evolución de la enfermedad ( $r = 0.6689$ ,  $p = 0.034$  Correlación de Spearman).



**Figura 25. Análisis de correlación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y el % de fagocitosis por monocitos de pacientes.** Cada punto representa una muestra de un paciente con SSp individual. Los resultados se analizaron utilizando el test de Spearman.

Asimismo, analizamos posibles asociaciones entre la presencia de VPAC2 y fagocitosis, VPAC2 y tiempo de evolución, VPAC2 y tratamiento con hidroxicloroquina y VPAC2 y manifestaciones extraglandulares. Ninguna de estas asociaciones dio una diferencia significativa con la prueba  $\chi^2$ .

### Conclusiones parte II

Por lo tanto concluimos que los monocitos de pacientes con SSp presentan una alterada capacidad de fagocitar células epiteliales apoptóticas y de sintetizar durante el proceso mediadores que favorezcan un microambiente inmunosupresor. El VIP no revirtió este fenotipo alterado de los monocitos ni en su función fagocítica ni modulando la síntesis de mediadores. Se observa una correlación positiva entre la disminuida capacidad fagocítica y el tiempo de evolución de la enfermedad.

## PARTE III

## Interacción de células epiteliales de glándula submaxilar humana con monocitos de pSS y modulación por VIP

Estudios previos han demostrado que células epiteliales de glándula salival derivadas de pacientes con SSp presentan una activación aberrante con expresión aumentada de receptores de tipo Toll, entre otros marcadores pro-inflamatorios. En base a estos datos nos interesó estudiar si las células mononucleares de pacientes con síndrome de Sjögren eran capaces de inducir marcadores pro-inflamatorios o apoptosis en células epiteliales de glándula submaxilar, apoyando la hipótesis que una activación aberrante del epitelio genera una perpetuación de la enfermedad.

Para esto realizamos co-cultivos de células de la línea HSG con células mononucleares totales de pacientes con SSp o voluntarios sanos como control. Empleamos un sistema de *transwell* de 0,4  $\mu\text{m}$  que no permite el contacto celular. Encontramos que las células mononucleares totales (MNT) de pacientes con SSp inducen un incremento en la expresión de MCP-1, IL-6, TLR3 y TLR4 en las células epiteliales de glándula submaxilar (HSG) (Figura 26a). El incremento de MCP-1 se confirmó en los sobrenadantes de co-cultivos con MNT de pSS por ELISA (Figura 26b).

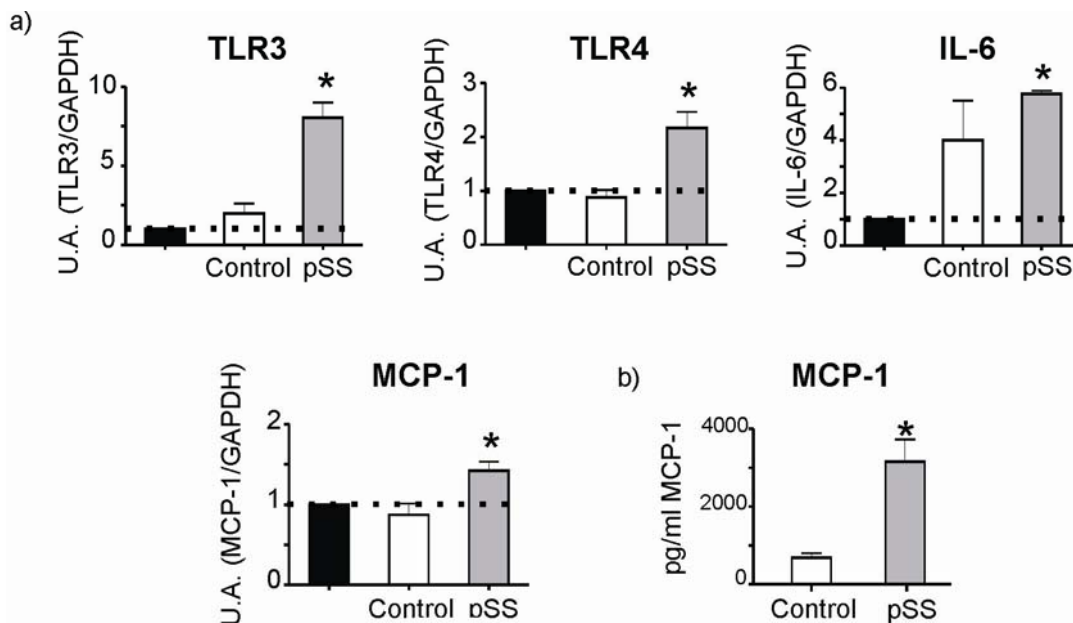
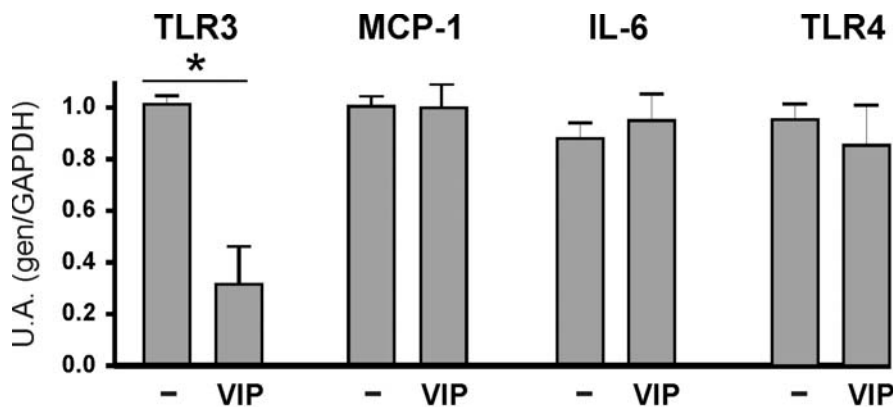


Figura 26. Aumento de la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células HSG inducida por MNT de SSp.

Células MNTs de controles (n=5) y pacientes SSp (n=5) fueron co-cultivadas en un sistema de *transwell* con células HSG durante 24 h. a) Las células HSG fueron analizadas por RT-PCR para determinar los niveles de expresión a nivel del RNAm de TLR3, TLR4, IL-6 y MCP-1. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 5 experimentos independientes \*P < 0,05 vs. basal. b) En los sobrenadantes del co-cultivo se cuantificó la secreción de MCP-1 por ELISA como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 5 experimentos independientes. \* P < 0,05 vs. control.

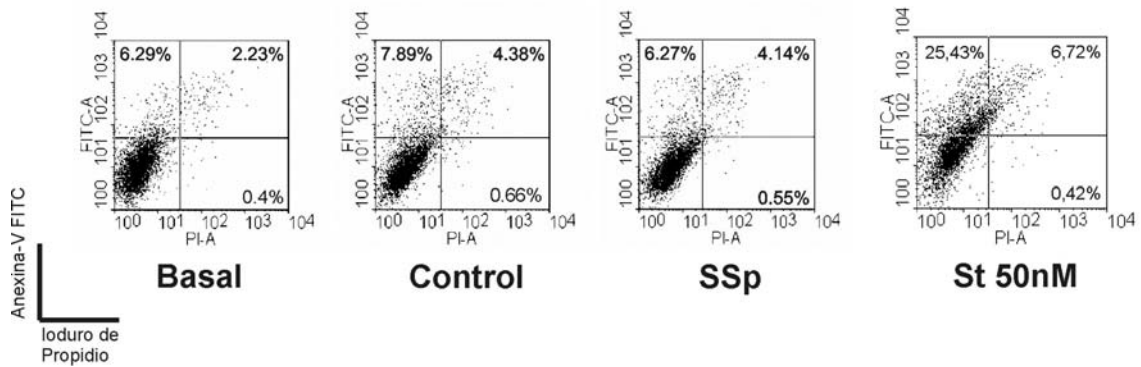
A continuación quisimos determinar si el tratamiento con VIP era capaz de modular estos incrementos en la expresión de marcadores inflamatorios. Observamos en la figura 27 que VIP inhibió la inducción de TLR3 en aproximadamente un 50% sin modificar la expresión de MCP-1, IL-6 y TLR4.



**Figura 27. VIP reduce la expresión de TLR3 inducida por MNT en células epiteliales de glándula submaxilar HSG.**

Células MNT de controles (n=5) y pacientes SSp (n=5) fueron cocultivadas en un sistema de *transwell* con poro de 0,4  $\mu$ m con células HSG durante 24 h en presencia o ausencia de VIP 100nM. Las células HSG fueron analizadas por RT-PCR para determinar los niveles de expresión a nivel del RNAm de TLR3, TLR4, MCP-1 e IL-6. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.S. de al menos 4 experimentos independientes \* P < 0,05.

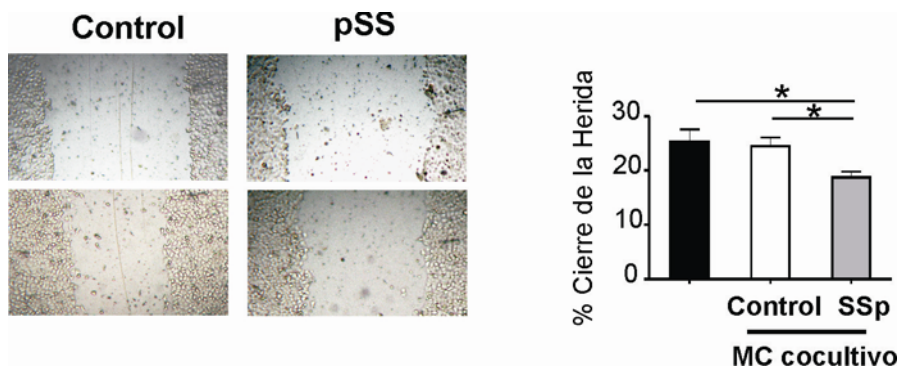
Otra característica observada en biopsias de glándulas de pacientes con SSp es una mayor apoptosis de células epiteliales con pérdida de acinos funcionales. Basados en estos antecedentes nos preguntamos si las células MNT de pacientes eran capaces de promover la apoptosis de células epiteliales. Para esto realizamos co-cultivos en sistemas de *transwells* de 0,4  $\mu$ m durante 24 h y luego analizamos el porcentaje de células epiteliales apoptóticas en el compartimiento inferior por marcación de anexina V/IP. Como se muestra en la figura 28 en ninguno de los cultivos se observó un incremento en la apoptosis.



**Figura 28. El co-cultivo de células HSG con MNT de pacientes con SSp no induce apoptosis en las células HSG.** Células MNT de controles (n=3) y pacientes SSp (n=4) fueron co-cultivadas durante 24 h con células HSG utilizando un sistema de *transwell* (0,4 μm). La apoptosis de las células HSG fue analizada por marcación de anexinaV-IP por citometría de flujo. *Dot plots* representativos de 3 experimentos independientes.

Luego nos interesó estudiar si la interacción de las células MNT de pacientes con SSp alteraba el perfil funcional de las células epiteliales, particularmente en su capacidad de migrar y diferenciarse.

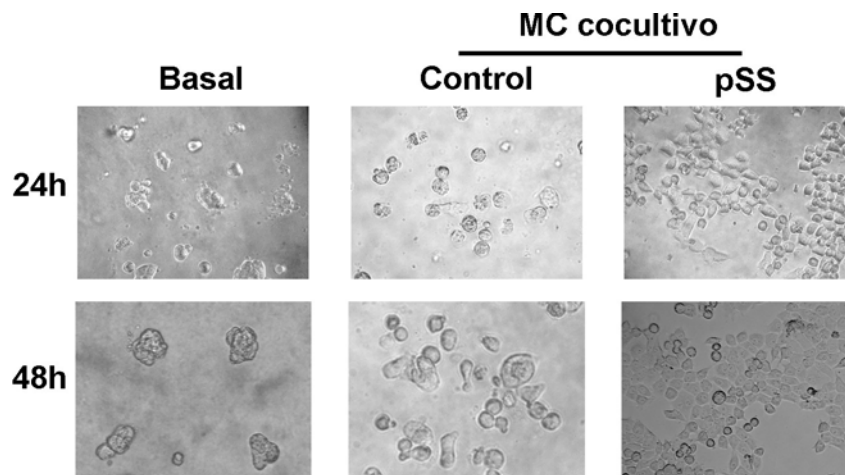
Para esto realizamos ensayos de reparación de la herida en monocapas de células HSG. La figura 29 muestra que el medio condicionado del co-cultivo de células MNT de pacientes con SSp con células HSG inhibe la migración de las células epiteliales en los bordes de la herida en la monocapa, comparado con el medio condicionado de los dadores sanos (control) o el medio solo.



**Figura 29. Menor migración de células HSG por incubación con medio condicionado de MNT SSp-HSG.** Medios condicionados (MC) de co-cultivos HSG/MNT SSp (n=4) y HSG/MNT control (n=3) fueron utilizados para determinar su efecto en la proliferación de células HSG en un ensayo de cierre de la herida como se describe en Materiales y Métodos. Fotografías representativas de al menos 3 experimentos independientes.  $X \pm E.S.$  \*  $P < 0,05$ .



Luego analizamos el efecto del medio condicionado sobre la diferenciación de las células HSG en Matrigel. Observamos una reducción en la formación de estructuras tanto tubulares como la formación de cúmulos o *clusters* celulares asimilables a acinos cuando se cultiva a las células HSG con el medio condicionado del co-cultivo con MNT de pSS (Figura 30).



**Figura 30.** Alteración en la diferenciación de células HSG inducida por medio condicionado de MNT SSp-HSG. Células HSG fueron cultivadas sobre Matrigel para inducir su diferenciación hacia un fenotipo acinar. Medios condicionados de HSG/SSp (n=3) y HSG/control (n=3) fueron utilizados para determinar su efecto en la diferenciación. Las fotografías son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

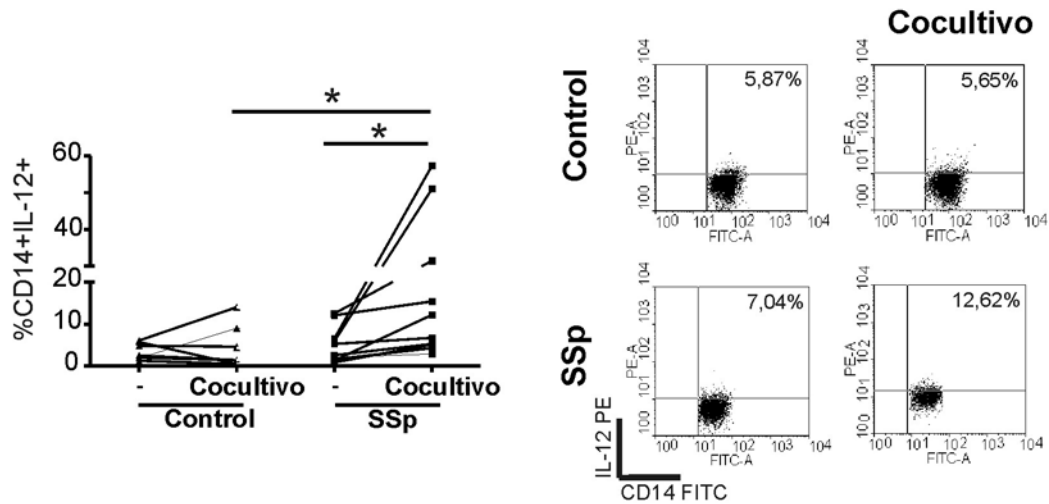
Por lo tanto podemos decir que el medio condicionado de MNT de pSS co-cultivos con células epiteliales interfiere tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células epiteliales glandulares HSG.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta aquí con las células HSG, sabiendo que el epitelio secretor es un actor clave en la generación de un ambiente pro-inflamatorio en glándulas de pacientes con SSp, y habiendo observado que la interacción de células MNT con células epiteliales HSG indujo la expresión y liberación de MCP-1, un potente quimioattractante de monocitos/macrófagos, hipotetizamos que las células CD14+ de los pacientes podrían variar su perfil fenotípico al entrar en contacto con células epiteliales HSG. Para probarlo realizamos co-cultivos de células mononucleares totales de pacientes o controles con células HSG y luego de 24 h determinamos la expresión de IL-12 e IL-10 en células CD14+ por citometría de

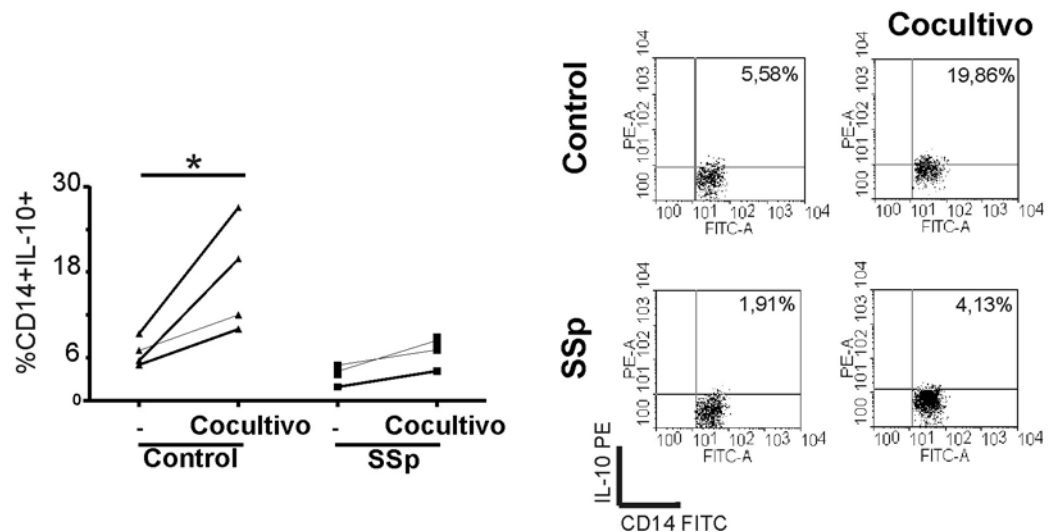
flujo.

La figura 31 muestra un aumento de la frecuencia de células CD14+IL-12+ luego del co-cultivo, solo en las muestras de los pacientes mientras que, por el contrario, la síntesis de IL-10 que se encontró aumentada en células CD14+ de individuos sanos, no aumentó en los monocitos de pacientes por el co-cultivo con HSG.

a)



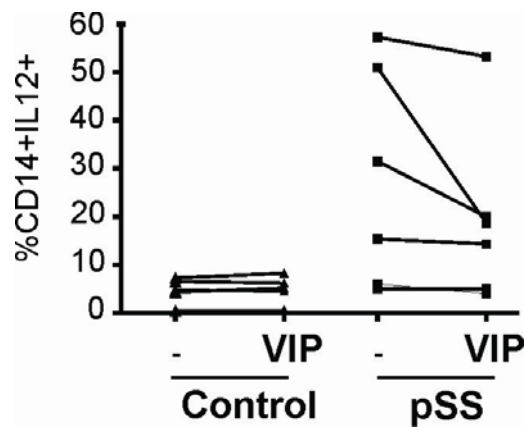
b)



**Figura 31. Incremento en la producción de células CD14+IL12+ luego de la interacción de células HSG con MNT de pSS.** Células HSG fueron co-cultivadas con MNT de pacientes con SSp o controles. Luego de 24 h de co-cultivo las células se recuperaron y se realizaron marcaciones para citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. a) % de células CD14+IL12+ y b) % de células CD14+IL10+. Cada punto representa el valor de % de pacientes o voluntarios sanos estudiados individualmente. Los dot plots son representativos. \* P < 0,05.

Asimismo, observamos que el tratamiento con VIP del co-cultivo solo muestra una

tendencia a revertir parcialmente la producción de IL-12 en monocitos de pacientes con SSp (Figura 32).



**Figura 32.** VIP modula solo parcialmente el incremento en la producción de células CD14+IL12+ luego de la interacción de células HSG con MNT de pSS. Células HSG fueron co-cultivadas con MNT de pacientes con SSp o controles en presencia o no de 100 nM de VIP. Luego de 24 h de co-cultivo las células se recuperaron y se analizó el porcentaje de células CD14+IL-12+ por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran los valores de % de células de pacientes o voluntarios sanos estudiados individualmente.

### Conclusiones parte III

Los resultados indican que la interacción de células mononucleares totales de pacientes con síndrome de Sjögren con células epiteliales de glándula submaxilar humana aumenta la expresión de marcadores pro-inflamatorios (TLR3, TLR4, MCP1, IL6) en las células epiteliales. Por otro lado, las células epiteliales adquieren un perfil funcional alterado con disminución en su capacidad de diferenciarse y migrar. Paralelamente, los monocitos de los pacientes con síndrome de Sjögren luego de la interacción con HSG incrementan su producción de IL-12 y disminuyen la de IL-10 contrariamente a lo que ocurre en los monocitos de controles. En este panel de ensayos, el VIP solo tuvo efectos parciales disminuyendo la expresión de TLR3 en células epiteliales y una tendencia a disminuir la producción de IL-12 en monocitos de pSS.

# **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

El Síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune cuyo síntoma cardinal es la pérdida de la función secretoria salival y lacrimal. Los mecanismos patogénicos son desconocidos en la actualidad. Se propone que previo a la manifestación autoinmune existe una pérdida de la homeostasis glandular que aumenta la susceptibilidad a un ataque autoinmune, el cual a su vez deteriora progresivamente la función secretoria. Es por esto que en los últimos años se ha intentado profundizar en el conocimiento de los eventos tempranos en la glándula que podrían conducir a la sintomatología *sicca* y comprender la inmunobiología de los tejidos blanco, para aportar así al desarrollo de biomarcadores que facilitarían tanto el diagnóstico como el tratamiento de la enfermedad.

El estudio del VIP en el SS tiene un valor particular por su doble papel como neuropéptido pro-secretor en glándulas salivales en condiciones normales e inmunomodulador en numerosos modelos de inflamación crónica y autoinmune. A su vez, el VIP tiene efectos anti-apoptóticos en acinos y tróficos en glándulas salivales, lo que le suma interés a su estudio en esta enfermedad.

Un obstáculo para estudiar eventos tempranos de ruptura de la homeostasis glandular es que al momento del diagnóstico de SS en pacientes, en general, la enfermedad está avanzada. En este sentido, los modelos murinos resultan de gran utilidad. Es por esto que en la primera parte de esta tesis empleamos el modelo experimental de SS en ratones NOD adultos de distintas edades para poder evaluar eventos tempranos en la ruptura de homeostasis glandular previo a la manifestación autoinmune, con especial foco en la expresión y actividad del VIP y sus receptores VPAC.

En primer lugar describimos las alteraciones estructurales y funcionales de las glándulas submaxilares de los ratones NOD comparado con los controles BALB/c. Los ratones NOD presentaron disminuida su capacidad secretoria a las 16 semanas de edad con una tendencia a la disminución a la semana 8. Además la histología glandular se vio afectada con un aumento en la relación ductos:acinos y presencia de células apoptóticas. Asimismo, comprobamos que cultivos de acinos aislados de glándulas de ratones NOD presentan un incremento en el porcentaje de células apoptóticas

(positivas para anexina V) que no se observó en las células acinares aisladas de ratones controles. Los resultados son consistentes con la caracterización de esta cepa como modelo de SS [34, 131, 140]. En particular la mayor apoptosis de células acinares de ratones NOD observada aquí junto con la observación previa que la relación ductos:acinos ya aparece aumentada desde las 10 semanas [131], aporta nueva evidencia a la hipótesis de alteraciones funcionales y estructurales que preceden a la respuesta autoinmune con infiltración de las glándulas presente entre las 16 y 20 semanas de edad.

En línea con esta propuesta, al analizar el perfil de expresión de VIP y sus receptores VPAC en glándulas de ratones NOD desde el nacimiento observamos una progresiva pérdida en la expresión relativa de VIP/VPAC1 en las glándulas de ratones NOD que no se observa en ratones controles. Dado que el neuropéptido no se expresa en las células acinares [135] descartamos que la disminución en la expresión de VIP descrita en las glándulas corresponda a una pérdida de acinos por apoptosis.

Cabe destacar que la disminución en la expresión relativa de VIP/VPAC es similar a la cinética de pérdida de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa 1 (NOS 1) y a la reducción en la respuesta secretoria frente a la estimulación de los receptores muscarínicos previamente descrita en estos ratones [141]. La isoforma neuronal NOS 1 normalmente se localiza en las fibras neurales en la proximidad de las células epiteliales glandulares y favorece la secreción salival. Además el VIP, que estimula la secreción acuosa y proteica [59, 142], induce la expresión de la NOS 1 en neuronas la cual a su vez regula la expresión de VIP, de hecho ratones *knock out* para la isoforma neural de la NOS expresan bajos niveles de VIP neuronal.

En cuanto a la relación entre la disminución en la expresión del VIP en las glándulas NOD y la mayor apoptosis de acinos que describimos aquí, el VIP se inmunolocaliza en las fibras nerviosas que rodean a los acinos ejerciendo efectos tróficos en las glándulas [57, 143] como también anti-apoptóticos en acinos aislados [36]. En línea con estas observaciones, en biopsias de glándulas labiales de pacientes con SSp además del aumento en el número de células apoptóticas [34, 35] se ha descrito una menor inervación por fibras positivas para VIP [144], lo que ha llevado recientemente a proponer el uso de dispositivos de aplicación local en la cavidad oral en pacientes con

SS para favorecer la liberación de estímulos tróficos y anti-apoptóticos por las terminales nerviosas, con el fin de generar efectos a largo plazo en el parénquima de las glándulas y la restitución del flujo salival [145].

Finalmente, la disminución en la expresión de VIP tuvo una cinética similar al aumento en la expresión de TLR4 en las glándulas de ratones NOD.

Diversos estudios en modelos experimentales de inflamación y en células de pacientes analizadas *ex vivo* han demostrado que el tratamiento con VIP produce una disminución en la expresión de TLR4 [146-148]. Además, una inyección intra-peritoneal de VIP en ratones C57/B6 reduce los niveles de ARN mensajero y proteína de TLR4 en corneas infectadas con *Pseudomona aeruginosa* [149], mientras que en un modelo murino de daño hepático por isquemia-reperfusión el tratamiento *in vivo* con VIP 5 y 10 nmol induce una disminución en TLR4 y se reduce el daño hepático [150].

Por otro lado, en estudios moleculares utilizando cultivos primarios de glándula submaxilar humana de pacientes con SS (células SGEC) se ha reportado la capacidad de las células epiteliales para iniciar y perpetuar la respuesta inflamatoria [28]. Se ha descrito una activación intrínseca de las células acinares, expresando distintas proteínas como CMH I y II, CD40, CD80, CD86, todas moléculas co-estimuladoras en el sistema inmune, o también TLR2, TLR3, TLR4, y MyD88. Asimismo estudios recientes han demostrado que componentes de la matriz celular como el biglicano, que actúan a través de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), inducen la expresión de TLR4 [151]. Este ligando se encuentra expresado en glándulas submaxilares de ratones NOD previo a la infiltración linfocitaria [152].

Por lo tanto, el incremento progresivo en la expresión de TLR4 observado en los ratones NOD podría ser una consecuencia de su inducción por DAMPs endógenos sumada a la falta de efecto del VIP por estar reducida su propia expresión.

Los resultados discutidos hasta aquí son consistentes con el modelo que propone que la patología semejante al SS en los ratones NOD se divide en 2 fases donde la primera fase es independiente del ataque autoinmune y estaría mediada por defectos tempranos en la homeostasis glandular [34]. En efecto, tanto en ratones NOD como en pacientes con SS se han descrito autoanticuerpos que reconocen proteínas glandulares y receptores muscarínicos de glándulas [153-155] pero éstos aparecen

años después del comienzo de la sintomatología. Estos anticuerpos interfieren con la secreción glandular cuando se transfieren a ratones o se analizan en ensayos *in vitro*, en línea con un efecto de la respuesta autoinmune para exacerbar la falla funcional.

La propuesta sobre un defecto estructural-funcional en las glándulas que contribuye a conferir susceptibilidad para el desarrollo de autoinmunidad, que a su vez promueve mayor daño funcional, tiene antecedentes en otros modelos de autoinmunidad, como por ejemplo el procesamiento deficiente de iodo por células epiteliales en el inicio de la tiroiditis autoinmune en cepas susceptibles [156]. En esta línea, más recientemente se ha propuesto que defectos estructurales en las glándulas salivales ya desde etapas perinatales podrían incrementar la susceptibilidad a padecer el síndrome de Sjögren en la adultez. Así, resulta interesante la identificación de eventos moleculares y cambios estructurales durante el desarrollo embrionario de la glándula cuya desregulación pudiera favorecer un ataque autoinmune. Estudios previos han demostrado que las glándulas salivales de ratones NOD neonatos (1 día postnatal) presentan una diferenciación retrasada con una menor proliferación de células acinares y un incremento en la expresión de Fas, FasL y Bcl-2. Además presentan un incremento en la actividad de las metaloproteasas 2 y 9 [54]. Por otro lado Enger y colaboradores reportaron un fenotipo ductal alterado en glándulas submaxilares embrionarias de ratones NOD desde el día E13 al día E18 [157].

Nuestros resultados avalan y aportan nuevas evidencias a estas observaciones, ya que muestran que las glándulas salivales de ratones NOD en etapas embrionarias tienen menores niveles de expresión de expresión de VIP comparado con la cepa BALB/c usada aquí como control y la CF1 ya descrita, aunque mantienen una cinética similar. Por otro lado, presentan una cinética desregulada de la expresión de VPAC1 y VPAC2. Mientras que en los controles se observa una expresión reducida o ausente de VPAC2, en las glándulas submaxilares embrionarias de ratones NOD se detecta entre E13 y E16, y en cuanto a la expresión de VPAC1 no se detectan niveles significativos ni sigue la cinética de los controles.

En el estudio de Enger y colaboradores [157] utilizaron glándulas submaxilares embrionarias de ratones NOD en 3 estadios distintos: E13 para representar la



morfogénesis temprana, E15 representativa de citodiferenciación inicial y E18 como representante de la citodiferenciación final. Encontraron defectos estructurales en las glándulas submaxilares embrionarias en los 3 estadios, sin embargo al día E15 las diferencias fueron significativamente mayores. Es por esta razón que decidimos ver el efecto del tratamiento con VIP en ese estadio. El tratamiento *in vitro* de SMG E15 de ratones NOD con VIP indujo un incremento en el tamaño de los ductos principales y secundarios. Además se observó una inducción en la expresión del mensajero de un marcador característico de células ductales como es la citoqueratina 19. Recientemente Nedvetsky y colaboradores reportaron que el VIP, secretado por nervios parasimpáticos, direcciona la tubulogénesis epitelial en glándulas salivales embrionarias [65]. Basados en estas observaciones y las del estudio de Enger y colaboradores, los bajos niveles de VIP encontrados por nosotros al día E13 podrían explicar la dismorfogénesis encontrada en los ductos de las glándulas de ratones NOD. Los resultados obtenidos en el tratamiento *in vitro* con VIP en glándulas E15 apoyan esta propuesta.

Más aún, proponemos que la expresión disminuida de VIP y/o la expresión desregulada de los receptores VPAC1 y VPAC2 asociada a la formación de ductos aberrantes en las glándulas submaxilares embrionarias de ratones NOD preceden a los defectos estructurales y funcionales en las glándulas submaxilares adultas.

Los defectos en la expresión del sistema VIP/VPAC en glándulas salivales de ratones NOD adultos y en la etapa embrionaria nos llevaron a estudiar la histología y función de las glándulas salivales de ratones deficientes en VIP. Encontramos que sus glándulas presentan alteraciones histológicas con pérdida de la citoarquitectura característica del parénquima glandular normal.

Al estudiar la función secretoria encontramos un estado de hipersecreción sin aumento en la concentración de electrolitos y con una tendencia a disminuir la concentración proteica en los ratones KO respecto a los ratones WT. Estas diferencias se vieron asociadas con un aumento en la expresión del canal de agua, acuaporina 5.

Los niveles de expresión de AQP5 en las biopsias de glándulas correlacionan con el flujo salival no solo en pacientes sino también en individuos sanos. Dadas estas

evidencias Wang y colaboradores sugieren que los niveles glandulares de AQP5 podrían ser usados como indicadores del flujo salival [158]. Sin embargo, la concentración de AQP5 se encontró significativamente aumentada en lágrimas de pacientes con SS respecto a pacientes controles sugiriendo que no solo su expresión sino la localización celular del canal aportan a su funcionalidad [43]. De hecho, en pacientes con SS y en el modelo NOD se encontró una pérdida de polaridad en la localización de la AQP5 que aparece tanto en la región apical como en la basolateral de las células secretorias, con la consecuente pérdida de parte del agua destinada a secretarse que pasa al intersticio [41]. En línea con esta observación, en pacientes tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  (infliximab) se restaura la polaridad de AQP-5, apoyando la contribución de citoquinas pro-inflamatorias producidas localmente al reducido flujo salival en el SS [41, 159]. Asimismo, se ha demostrado que la expresión ectópica y sobre-expresión de AQP5 inducen cambios fenotípicos en distintas líneas celulares con aumento de proliferación y transformación tanto *in vitro* como *in vivo* [160]. A futuro, resulta de interés determinar la localización subcelular de AQP5 para profundizar en su participación en los cambios en la estructura glandular observada en los ratones deficientes en VIP. Es importante destacar que no encontramos diferencias en la expresión de marcadores específicos poblacionales como son E-caderina, Claudina-8 y Tubulina  $\beta$ -3 en los ratones KO, lo que nos lleva a proponer que la existencia de defectos en la polarización y organización celular, sin embargo, no estaría afectando la diferenciación celular.

Si bien al presente no se han reportado cambios en la secreción salival en ratones VIP KO, se ha demostrado que los ratones KO para el péptido presentan hipertensión arterial pulmonar asociada primariamente a la falta de efecto relajante muscular del VIP en las arterias pulmonares [161]. No se descarta que, secundariamente a la hipertensión pulmonar, la falta de VIP también pueda facilitar una respuesta pro-inflamatoria en estos ratones. Sin embargo, vale destacar que los ensayos empleando ratones VIP KO no han resultado definitivos para demostrar el papel inmunomodulador del VIP en condiciones de exacerbación de la respuesta autoinmune o inflamatoria como son los modelos experimentales inducidos. Así, se ha reportado que los ratones deficientes en VIP son resistentes tanto al shock séptico inducido por

administración intra-peritoneal de LPS [162], como a la inducción de colitis inducida por TNBS [123] y a la encefalomiелitis autoinmune inducida por proteína básica de mielina [163], sugiriendo la complejidad de la actividad del VIP endógeno.

Las evidencias discutidas hasta aquí con los distintos modelos murinos demuestran que una desregulación del sistema VIP/VPAC se asocia con cambios estructurales en las glándulas, aumento de apoptosis de acinos, expresión de marcadores pro-inflamatorios y defectos en la función, todos eventos relacionados con la pérdida de la homeostasis glandular.

El mantenimiento de la homeostasis tisular requiere que las células apoptóticas sean rápidamente fagocitadas y eliminadas para evitar la necrosis secundaria que induce la exposición de auto-antígenos y que el proceso tenga lugar en un microambiente anti-inflamatorio. Una actividad fagocítica deficiente por parte de monocitos/macrófagos puede dar lugar a una respuesta deletérea, pro-inflamatoria y desregulada con pérdida de la homeostasis tisular y autoinmunidad. Entre los fagocitos profesionales, los macrófagos son células que muestran gran plasticidad, capaces de regular los diversos procesos en los que intervienen modulando su actividad en relación al microambiente en el que son reclutados o estimulados [83, 84]. A su vez, los monocitos circulan en la sangre y migran a los tejidos desde el compartimiento plasmático, donde maduran o se diferencian ejerciendo una diversidad de funciones efectoras. Estas células también vinculan la respuesta inmune innata y adaptativa frente a patógenos u otros insultos del tejido; modulan el crecimiento de células tumorales, facilitan procesos de cicatrización y de remodelación tisular [82]. Experimentos *in vitro* han demostrado que la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos induce la secreción de citoquinas y mediadores anti-inflamatorios como TGF- $\beta$ , IL-10 y PGE<sub>2</sub> y una reducción de la producción de nitritos e inducción de NOS 2 [75, 76].

En este marco, en primer lugar, estudiamos la respuesta de los macrófagos NOD frente a células acinares apoptóticas. Los resultados indican que los macrófagos de hembras NOD presentan reducido su índice fagocítico y que el fenotipo inflamatorio basal con altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias y nitritos fue revertido durante la fagocitosis de células acinares apoptóticas. El VIP estabilizó un fenotipo regulatorio en

los macrófagos NOD aumentando los niveles de producción de IL-10, consistente con el papel inmunosupresor del neuropéptido.

Teniendo en cuenta estos resultados, en la segunda parte de la tesis quisimos estudiar la existencia de defectos en el proceso fagocítico en monocitos de pacientes con síndrome de Sjögren. Demostramos que los monocitos de pacientes con SSp presentan una fagocitosis desregulada de células epiteliales apoptóticas con menor capacidad fagocítica y un defecto en la promoción de un ambiente anti-inflamatorio durante la fagocitosis, ya que aumentó la síntesis de TNF- $\alpha$  pero no la de IL-10.

Al momento de nuestro estudio solo se había informado sobre un déficit en la remoción de cuerpos apoptóticos por macrófagos en el LES. En efecto, macrófagos diferenciados a partir de monocitos o células madre de pacientes con lupus presentaron anormalidades morfológicas y alterada fagocitosis de células apoptóticas [164, 165]. Además macrófagos de pacientes con LES o AR tienen menor tamaño y una menor capacidad para diferenciarse y adherirse a células T Jurkat apoptóticas [166]. Sin embargo, solo los macrófagos de pacientes con lupus pero no los de pacientes con artritis presentan disminuida su capacidad fagocítica, lo que lleva a hipotetizar la existencia de defectos celulares intrínsecos responsables de esta falla funcional. En línea con esa hipótesis, en pacientes con LES también se detectó la producción aberrante de citoquinas pro-inflamatorias asociadas a la fagocitosis de células apoptóticas que parece asociarse a fallas intrínsecas de los monocitos ya que no se relaciona con la severidad de la enfermedad [167].

Es interesante destacar que casi simultáneamente con nuestra observación de reducida fagocitosis de células epiteliales de glándula submaxilar humana apoptóticas por monocitos de pacientes con SSp, intentando recrear *in vitro* la interacción inmune-epitelial en el SSp, otros autores describieron una fagocitosis aberrante de bolitas de látex [168] por monocitos de pacientes con SS y, en un estudio posterior, la fagocitosis alterada de células T Jurkat apoptóticas por monocitos y macrófagos derivados de pacientes [169]

Por otro lado, en un estudio que comparó la capacidad fagocítica de neutrófilos apoptóticos por las distintas subpoblaciones de monocitos CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>+</sup>

y  $CD14^{dim}CD16^+$  se observó que monocitos de la subpoblación  $CD16^+$  ( $CD14^{hi}$  y  $CD14^{dim}$ ) son particularmente efectivos en la remoción de cuerpos apoptóticos respecto a los  $CD16^-$  en sujetos controles como en pacientes con lupus [103]. En pacientes con SS se reportó un incremento en la población  $CD16^+$  [170]. Teniendo en cuenta lo observado en monocitos  $CD16^+$  de pacientes con lupus no podemos descartar que el incremento en el porcentaje de células  $CD16^+$  en pacientes con SSp represente un mecanismo para compensar la disminuida capacidad fagocítica evidenciada en nuestros resultados.

Otro aspecto a destacar es la correlación que observamos entre la capacidad fagocítica de monocitos de pacientes con SSp y el tiempo de evolución de la enfermedad, lo que sugiere que el defecto en la fagocitosis ocurre en las primeras etapas de la enfermedad con una aparente recuperación con los años de evolución en los pacientes con SSp, consistente con la alta frecuencia de monocitos  $CD16^+$ .

En nuestro estudio no observamos efectos del tratamiento *in vitro* con VIP ni en la fagocitosis ni en la síntesis de citoquinas pro o anti-inflamatorias durante la fagocitosis en monocitos de pacientes con SSp. Existen diversos estudios sobre el efecto de VIP en la fagocitosis con resultados contrapuestos. Por un lado algunos autores utilizando macrófagos de ratas ven una estimulación del proceso fagocítico de bacterias y bolitas de látex en presencia del neuropéptido [171]. Por otro lado VIP incrementa marcadamente la fagocitosis de fibrillas A $\beta$ 42 [172]. En ambos casos este incremento en la actividad fagocítica está asociado a la activación de la vía de señalización de PKC. Sin embargo también se reportó que la capacidad fagocítica de bolitas de poliestireno de macrófagos peritoneales murinos se ve disminuida en presencia de VIP [173].

Se ha reportado que el receptor VPAC1 está expresado en monocitos humanos en condiciones de reposo mientras que el VPAC2 está ausente y, en general para estas células como para los linfocitos T, se ha descrito que ambos receptores pueden aumentar o disminuir su expresión dependiendo del estímulo [174, 175]. Particularmente la expresión del receptor VPAC2 aumenta en macrófagos peritoneales de ratón, como también en líneas celulares de macrófagos, cuando son tratados *in vitro* con estímulos que activan TLR2 y TLR4 [138], lo que sugiere que la sobre-expresión de dicho receptor podría representar un marcador de activación.

En este trabajo demostramos que el receptor VPAC2 en condiciones basales se encuentra expresado en los monocitos de pacientes con SSp mientras que esto no ocurre en los monocitos de voluntarios sanos analizados como control. Por otro lado al estimular con LPS observamos una inducción del receptor. Cabe destacar que este efecto del LPS sobre la expresión de VPAC2 solo ocurre en monocitos de pacientes con SSp. El resultado está en línea con lo observado en macrófagos murinos al estimular con LPS, agonista de TLR4, donde la expresión del receptor VPAC2 se induce hasta 3 veces [176]. Por último, VIP inhibió la inducción de VPAC2 solamente cuando las células fueron inducidas con LPS. El hecho que, a diferencia de la falta de efecto en la fagocitosis de células apoptóticas, el VIP sí pudo inhibir la inducción del VPAC2 por LPS en monocitos de SSp, confirma que los efectos anti-inflamatorios del VIP *in vitro* son más evidentes cuando las células inmunes son primadas con un potente estímulo pro-inflamatorio. Apoyando esta proposición, en células sinoviales de pacientes con artritis reumatoidea y osteoartritis VIP inhibió potentemente señales pro-inflamatorias cuando las células fueron estimuladas *in vitro* con poli I:C [177].

Se ha descrito una desregulación en la expresión de los receptores de VIP en células inmunes o asociadas a la respuesta inflamatoria en diversas enfermedades inflamatorias crónicas. En células sinoviales tipo fibroblásticas de pacientes con artritis reumatoidea se observó una elevada expresión del receptor VPAC2 junto a una disminuida expresión de VIP [178]. Esto sugiere que la expresión diferencial del receptor podría regular efectos locales de VIP *in vivo*. Por otro lado, en linfocitos T CD4+ de pacientes con HIV se encontró un incremento en los niveles de expresión de VPAC2 sin observar diferencias en la expresión de VPAC1[179]. Cabe destacar que, en nuestro estudio, los altos niveles de VPAC2 en monocitos de pacientes con SS no bastan para modular el perfil funcional de los mismos al tratarlos con VIP *ex vivo*. De hecho, ni los elevados niveles de VPAC2 ni la expresión de VPAC1 que es comparable a la de monocitos controles fueron capaces de favorecer una fagocitosis supresora luego del tratamiento *in vitro* con VIP.

Hasta el momento se dispone de escasa información sobre la regulación transcripcional de los receptores VPAC. Se conocen algunos represores de VPAC1 [180, 181], sin embargo, no hay reportes sobre reguladores transcripcionales para VPAC2.

Por lo tanto, quedan por dilucidar los mecanismos regulatorios involucrados en el incremento de VPAC2 que encontramos.

Si bien la relevancia funcional de la elevada expresión de VPAC2 en monocitos de pacientes con SSp debe ser estudiada con mayor profundidad en el futuro, la consistencia de esta observación en los casos de SSp estudiados, independientemente del tratamiento con hidroxicloroquina, la duración de la enfermedad o las manifestaciones extraglandulares, y a su vez la absoluta ausencia de la expresión de VPAC2 en monocitos de individuos sanos con su función fagocítica normal, sugiere el potencial del VPAC2 como biomarcador funcional en el síndrome de Sjögren.

Por último, en este trabajo profundizamos el estudio de posibles mecanismos patogénicos en asociados a la interacción inmune-epitelial en el síndrome de Sjögren y la participación de VIP utilizando un modelo *in vitro* de células inmunes mononucleares (MNT) aisladas de pacientes individuales y células epiteliales de glándula submaxilar humana, línea celular HSG. Este modelo nos permitió explorar posibles mecanismos innatos en la activación epitelial y el impacto en su función para aportar nuevas evidencias acerca de la participación del epitelio secretor en la patogénesis del SSp.

Nuestros resultados muestran que la interacción de células HSG con MNT de pacientes con SSp induce la expresión de marcadores pro-inflamatorios en las células epiteliales, particularmente de MCP-1 e IL-6, conocidas por atraer monocitos/macrófagos. Además el medio condicionado del cocultivo de pacientes SSp-HSG afecta la capacidad migratoria y de diferenciación de las células epiteliales de glándula submaxilar humanas, reduciendo su capacidad de migrar y diferenciarse a estructuras tridimensionales semejantes a acinos.

Paralelamente, observamos que en las células CD14+ de pacientes con SS se induce la síntesis de IL-12 luego del co-cultivo sin aumento de IL-10, mientras que en las células CD14+ de los sujetos controles se observó la inducción de IL-10.

Se ha descrito que la administración de IL-12 exacerba fenómenos autoinmunes mediante la inducción de la diferenciación de células Th1 auto-reactivas [182]. Además, la sobreexpresión de IL-12 en ratones CBA conlleva a la infiltración mononuclear de las glándulas salivales y lagrimales [47], apoyando su rol central en la

patogénesis de la enfermedad. Similar a lo observado en la fagocitosis, el tratamiento con VIP *in vitro* tuvo un efecto anti-inflamatorio limitado sobre las señales inducidas durante el co-cultivo de células mononucleares totales de pacientes con células de epitelio glandular. Nuevamente, los altos niveles de VPAC2 expresados por los monocitos de pacientes no fueron suficientes para modular el fenotipo inflamatorio inducido por la interacción con células epiteliales.

Estos resultados sugieren que la interacción de células inmunes de pacientes con SS con células epiteliales de glándulas salivales favorece la generación de un microambiente pro-inflamatorio y el desarrollo de alteraciones funcionales en las células epiteliales que, en conjunto, podrían interferir en el mantenimiento de la homeostasis glandular. En línea con estos hallazgos, del análisis de biopsias de glándulas labiales de pacientes con SSp se desprende un rol patogénico de los defectos en la migración y diferenciación de células ductales o progenitoras acinares en el desarrollo de la enfermedad [183]. En dichas biopsias se observó degradación de fibronectina, laminina y colágeno de tipo IV por metaloproteasas y la desorganización de la matriz extracelular [183]. Estas alteraciones histológicas no se relacionan con el grado ni con la proximidad de los infiltrados mononucleares y sugieren, como se adelantó en capítulos anteriores, que defectos en la arquitectura y función glandular podrían iniciar la pérdida de la homeostasis tisular que incrementaría la susceptibilidad a un ataque autoinmune.

### **Conclusiones finales**

Nuestros resultados tomados en conjunto demuestran que alteraciones en la expresión y actividad del sistema VIP/VPAC tanto en las glándulas salivales estudiadas en distintos modelos murinos como en la interacción inmune-epitelial analizada en ratones y en células de pacientes con SSp se asocian con fallas funcionales y aumento de marcadores pro-inflamatorios. Las observaciones apoyan la hipótesis que un déficit en la fagocitosis de células apoptóticas y de ciertos mecanismos mediados por VIP endógeno podrían contribuir a la patogenia del SSp. Aunque con carácter preliminar, estos resultados también sugieren la potencialidad de estudiar la función fagocítica de los monocitos y la expresión de VPAC2 como posibles marcadores de defectos en la



interacción inmune-epitelial en pacientes con SSp.

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. Annals of the rheumatic diseases, 2002. **61**(6): p. 554-558.
2. Nannini, C., et al., *Primary Sjogren's syndrome 1976-2005 and associated interstitial lung disease: a population-based study of incidence and mortality*. BMJ open, 2013. **3**(11): p. e003569.
3. Ng, W.-F. and S.J. Bowman, *Biological therapies in primary Sjögren's syndrome*. Expert opinion on biological therapy, 2011. **11**(7): p. 921-936.
4. Fox, R.I., *Sjögren's syndrome*. The Lancet, 2005. **366**(9482): p. 321-331.
5. Kassan, S.S. and H.M. Moutsopoulos, *Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome*. Archives of Internal Medicine, 2004. **164**(12): p. 1275-1284.
6. Shiboski, S.C., et al., *American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: A data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort*. Arthritis care & research, 2012. **64**(4): p. 475-487.
7. Seror, R.I., et al., *EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): a user guide*. RMD Open, 2015. **1**(1): p. e000022.
8. Delaleu, N., et al., *High Fidelity Between Saliva Proteomics and the Biologic State of Salivary Glands Defines Biomarker Signatures for Primary Sjögren's Syndrome*. Arthritis & Rheumatology, 2015.
9. Tzioufas, A.G. and E.K. Kapsogeorgou, *Biomarkers: Saliva proteomics is a promising tool to study Sjogren syndrome*. Nature Reviews Rheumatology, 2015.
10. Ramos-Casals, M. and P. Brito-Zerón, *Emerging biological therapies in primary Sjögren's syndrome*. Rheumatology, 2007. **46**(9): p. 1389-1396.
11. Meijer, J.M., et al., *The future of biologic agents in the treatment of Sjögren's syndrome*. Clinical reviews in allergy & immunology, 2007. **32**(3): p. 292-297.
12. Mariette, X., et al., *Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study*. Annals of the rheumatic diseases, 2015. **74**(3): p. 526-3.
13. Devauchelle-Pensec, V., et al., *Treatment of Primary Sjögren Syndrome With Rituximab A Randomized Trial*. Annals of internal medicine, 2014. **160**(4): p. 233-242-242.
14. St Clair, E.W., et al., *Rituximab Therapy for Primary Sjögren's Syndrome: An Open-Label Clinical Trial and Mechanistic Analysis*. Arthritis & Rheumatism, 2013. **65**(4): p. 1097-1106.
15. Konttinen, Y., et al., *Sex steroids in Sjögren's syndrome*. Journal of autoimmunity, 2012. **39**(1): p. 49-56.
16. Konttinen, Y.T. and L. Kasna-Ronkainen, *Sjögren's syndrome: viewpoint on pathogenesis*. Scandinavian journal of rheumatology, 2002. **31**(2): p. 15-27.
17. Porola, P., et al., *Failure of oral DHEA treatment to increase local salivary androgen outputs of female patients with Sjögren's syndrome*. Scandinavian journal of rheumatology, 2011. **40**(5): p. 387-390.
18. Ishimaru, N., et al., *Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background*. The American journal of pathology, 2003. **163**(4): p. 1481-1490.
19. Shim, G.-J., et al., *Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren's syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(34): p. 12628-12633.

20. Fye, K.H., et al., *Relationship of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjögren's Syndrome*. Arthritis & Rheumatism, 1978. **21**(3): p. 337-342.
21. Mann, D.L. and H.M. Moutsopoulos, *HLA DR alloantigens in different subsets of patients with Sjögren's syndrome and in family members*. Annals of the rheumatic diseases, 1983. **42**(5): p. 533-536.
22. Reveille, J.D., et al., *Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses*. The Journal of Immunology, 1991. **146**(11): p. 3871-3876.
23. Nordmark, G., et al., *Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome*. Genes and immunity, 2009. **10**(1): p. 68-76.
24. Igoe, A. and R.H. Scofield, *Autoimmunity and infection in Sjögren's syndrome*. Current opinion in rheumatology, 2013. **25**(4): p. 480-487.
25. Ramos-Casals, M., S. Muñoz, and P.B. Zerón, *Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome: trigger or mimic?* Rheumatic Disease Clinics of North America, 2008. **34**(4): p. 869-884.
26. Hayashi, T., *Dysfunction of lacrimal and salivary glands in Sjögren's Syndrome: nonimmunologic injury in preinflammatory phase and mouse model*. BioMed Research International, 2011. **2011**.
27. Jonsson, R., et al., *The complexity of Sjögren's syndrome: novel aspects on pathogenesis*. Immunology letters, 2011. **141**(1): p. 1-9.
28. Manoussakis, M.N. and E.K. Kapsogeorgou, *The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome*. Journal of autoimmunity, 2010. **35**(3): p. 219-224.
29. Fox, R.I., *The Salivary Gland Epithelial Cell in Sjögren's Syndrome: What Are the Steps Involved in Wounding or Killing Their Secretory Function?* The Journal of rheumatology, 2012. **39**(6): p. 1117-1119.
30. Mavragani, C.P., N.M. Moutsopoulos, and H.M. Moutsopoulos, *The management of Sjögren's syndrome*. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2006. **2**(5): p. 252-261.
31. Voulgarelis, M. and A.G. Tzioufas, *Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome*. Nature Reviews Rheumatology, 2010. **6**(9): p. 529-537.
32. Deshmukh, U.S., et al., *Activation of innate immune responses through Toll-like receptor 3 causes a rapid loss of salivary gland function*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2009. **38**(1): p. 42-47.
33. Killedar, S.Y., et al., *Early pathogenic events associated with Sjögren's syndrome (SjS)-like disease of the NOD mouse using microarray analysis*. Laboratory Investigation, 2006. **86**(12): p. 1243-1260.
34. Kong, L., et al., *Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome: involvement of Bax in salivary gland destruction*. Clinical immunology and immunopathology, 1998. **88**(2): p. 133-141.
35. Badillo-Almaraz, I., et al., *FasL and Bax genes are differentially expressed in acinar epithelium and inflammatory cells of primary Sjogren salivary glands*. Minerva medica, 2003. **94**(5): p. 341-345.
36. Calafat, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide inhibits TNF-alpha-induced apoptotic events in acinar cells from nonobese diabetic mice submandibular glands*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(2): p. R53.
37. Low, H.Z. and T. Witte, *Aspects of innate immunity in Sjögren's syndrome*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(3): p. 218.
38. Molina, C., et al., *Basal lamina disorganisation of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: association with mononuclear cell infiltration*. Annals of the rheumatic diseases, 2006. **65**(2): p. 178-183.

39. Kramer, J.M., *Early events in Sjögren's Syndrome pathogenesis: The importance of innate immunity in disease initiation*. Cytokine, 2014. **67**(2): p. 92-101.
40. Steinfeld, S., et al., *Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients*. Laboratory Investigation, 2001. **81**(2): p. 143-148.
41. Konttinen, Y.T., et al., *Abnormal distribution of aquaporin-5 in salivary glands in the NOD mouse model for Sjögren's syndrome*. The Journal of rheumatology, 2005. **32**(6): p. 1071-1075.
42. Soyfoo, M.S., et al., *Link between inflammation and aquaporin-5 distribution in submandibular gland in sjögren's syndrome?* Oral diseases, 2012. **18**(6): p. 568-574.
43. Ohashi, Y., et al., *Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome*. American journal of ophthalmology, 2003. **136**(2): p. 291-299.
44. Lee, B.H., et al., *Animal models in autoimmune diseases: Lessons learned from mouse models for Sjögren's syndrome*. Clinical reviews in allergy & immunology, 2012. **42**(1): p. 35-44.
45. van Blokland, S.C.A. and M.A. Versnel, *Pathogenesis of Sjögren's syndrome: characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy*. Clinical Immunology, 2002. **103**(2): p. 111-124.
46. Donate, A., A. Voigt, and C.Q. Nguyen, *The value of animal models to study immunopathology of primary human Sjögren's syndrome symptoms*. Expert review of clinical immunology, 2014. **10**(4): p. 469-481.
47. Vosters, J.L., et al., *Interleukin-12 induces salivary gland dysfunction in transgenic mice, providing a new model of Sjögren's syndrome*. Arthritis & Rheumatism, 2009. **60**(12): p. 3633-3641.
48. Groom, J., et al., *Association of BAFF/BlyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(109 (1)): p. 59-68.
49. Lavoie, T.N., B.H. Lee, and C.Q. Nguyen, *Current concepts: mouse models of Sjögren's syndrome*. BioMed Research International, 2011. **2011**.
50. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. Jikken dobutsu. Experimental animals, 1980. **29**(1): p. 1-13.
51. Nguyen, K.H.T., et al., *Evidence for antimuscarinic acetylcholine receptor antibody-mediated secretory dysfunction in NOD mice*. Arthritis & Rheumatism, 2000. **43**(10): p. 2297-2306.
52. Robinson, C.P., et al., *Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD (nonobese diabetic)-scidmouse in the absence of detectable lymphocytic infiltration: a potential trigger for sialoadenitis of NOD mice*. Clinical immunology and immunopathology, 1996. **79**(1): p. 50-59.
53. Robinson, C.P., et al., *Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjögren syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(11): p. 5767-5771.
54. Cha, S., et al., *Abnormal organogenesis in salivary gland development may initiate adult onset of autoimmune exocrinopathy*. Experimental and clinical immunogenetics, 2001. **18**(3): p. 143-160.
55. Bulosan, M., et al., *Inflammatory caspases are critical for enhanced cell death in the target tissue of Sjögren's syndrome before disease onset*. Immunology and cell biology, 2008. **87**(1): p. 81-90.
56. Holsinger, F.C. and D.T. Bui, *Anatomy, function, and evaluation of the salivary glands, in Salivary gland disorders*. 2007, Springer. p. 1-16.

57. Ekstrom, J., *Autonomic control of salivary secretion*. Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia, 1988. **85**(4-5): p. 323-31; discussion 361-3.
58. Ekstrom, J., *Role of nonadrenergic, noncholinergic autonomic transmitters in salivary glandular activities in vivo*. 2004.
59. Endo, M., et al., *Effects of vasoactive intestinal polypeptide on acetylcholine stimulation of rat submandibular gland*. Endocrinologia japonica, 1987. **34**(3): p. 387-393.
60. Melvin, J.E., et al., *Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells*. Annu. Rev. Physiol., 2005. **67**: p. 445-469.
61. Delporte, C. and S. Steinfeld, *Distribution and roles of aquaporins in salivary glands*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2006. **1758**(8): p. 1061-1070.
62. Iber, D. and D. Menshykau, *The control of branching morphogenesis*. Open biology, 2013. **3**(9): p. 130088.
63. Larsen, M., K.M. Yamada, and K. Musselmann, *Systems analysis of salivary gland development and disease*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2010. **2**(6): p. 670-682.
64. Tucker, A.S. *Salivary gland development*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2007: Elsevier.
65. Nedvetsky, P.I., et al., *Parasympathetic Innervation Regulates Tubulogenesis in the Developing Salivary Gland*. Developmental cell, 2014. **30**(4): p. 449-462.
66. Kotas, M.E. and R. Medzhitov, *Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility*. Cell, 2015. **160**(5): p. 816-827.
67. Scrivo, R., et al., *Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases*. Autoimmunity reviews, 2011. **10**(7): p. 369-374.
68. Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. British journal of cancer, 1972. **26**(4): p. 239.
69. Poon, I.K.H., et al., *Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(3): p. 166-180.
70. Elliott, M.R., et al., *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 282-286.
71. Torr, E.E., et al., *Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells*. Cell Death & Differentiation, 2012. **19**(4): p. 671-679.
72. Truman, L.A., et al., *CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis*. Blood, 2008. **112**(13): p. 5026-5036.
73. Lauber, K., et al., *Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal*. Cell, 2003. **113**(6): p. 717-730.
74. Bournazou, I., et al., *Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(1): p. 20.
75. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(4): p. 890.
76. Martin, C.J., K.N. Peters, and S.M. Behar, *Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control*. Current opinion in microbiology, 2014. **17**: p. 17-23.
77. Green, D.R., et al., *Immunogenic and tolerogenic cell death*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(5): p. 353-363.

78. Kim, S., K.B. Elkon, and X. Ma, *Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells*. *Immunity*, 2004. **21**(5): p. 643-653.
79. Marek, C.J. and L.-P. Erwig, *Clearance of Apoptotic Cells: Mechanisms and Consequences*, in *Essentials of Apoptosis*. 2009, Springer. p. 261-282.
80. Huynh, M.-L.N., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation*. *The Journal of clinical investigation*, 2002. **109**(109 (1)): p. 41-50.
81. Ariel, A. and C.N. Serhan, *New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation*. *Frontiers in immunology*, 2012. **3**.
82. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. *The Journal of clinical investigation*, 2012. **122**(122 (3)): p. 787-795.
83. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(12): p. 958-969.
84. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular mechanisms that influence the macrophage M1/M2 polarization balance*. *Frontiers in immunology*, 2014. **5**.
85. Smale, S.T., *Selective transcription in response to an inflammatory stimulus*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 833-844.
86. Frausto-Del-Río, D., et al., *Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells*. *Cytokine*. **57**(1): p. 158-168.
87. Chazaud, B., *Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration*. *Immunobiology*, 2014. **219**(3): p. 172-178.
88. Novak, M.L. and T.J. Koh, *Macrophage phenotypes during tissue repair*. *Journal of leukocyte biology*, 2013. **93**(6): p. 875-881.
89. Schnoor, M., et al., *Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(8): p. 5707-5719.
90. Daley, J.M., et al., *The phenotype of murine wound macrophages*. *Journal of leukocyte biology*, 2010. **87**(1): p. 59-67.
91. Matsukawa, A., et al., *Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response*. *The Journal of Immunology*, 2005. **175**(5): p. 3354-3359.
92. Zizzo, G., et al., *Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction*. *The Journal of Immunology*, 2012. **189**(7): p. 3508-3520.
93. Ostuni, R., et al., *Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications*. *Trends in immunology*, 2015.
94. Zeyda, M., et al., *Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production*. *International journal of obesity*, 2007. **31**(9): p. 1420-1428.
95. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Adipose tissue macrophages*. *Immunology letters*, 2007. **112**(2): p. 61-67.
96. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P.S. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. *Nature Reviews Immunology*, 2011. **11**(11): p. 738-749.
97. Frankenberger, M., et al., *Transcript profiling of CD16-positive monocytes reveals a unique molecular fingerprint*. *European journal of immunology*, 2012. **42**(4): p. 957-974.
98. Lleo, A., et al., *The consequences of apoptosis in autoimmunity*. *Journal of autoimmunity*, 2008. **31**(3): p. 257-262.
99. Lowe, S.W. and A.W. Lin, *Apoptosis in cancer*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(3): p. 485-495.

100. Radi, E., et al., *Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Journal of Alzheimer's Disease, 2014. **42**: p. S125-S152.
101. Nagata, S., *Apoptosis and autoimmune diseases*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1209**(1): p. 10-16.
102. Hanayama, R., et al., *Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1147-1150.
103. Mikolajczyk, T.P., et al., *Characterization of the impairment of the uptake of apoptotic polymorphonuclear cells by monocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus*. Lupus: p. 0961203314541316.
104. Tas, S.W., et al., *Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells*. Annals of the rheumatic diseases, 2006. **65**(2): p. 216-221.
105. Henson, P.M. and R.M. Tuder, *Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2008. **294**(4): p. L601-L611.
106. McCubbrey, A.L. and J.L. Curtis, *Efferocytosis and lung disease*. CHEST Journal, 2013. **143**(6): p. 1750-1757.
107. Szondy, Z., et al., *Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications*. Frontiers in immunology. **5**.
108. Liu, Y., et al., *TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review*. Clinical reviews in allergy & immunology, 2014. **47**(2): p. 136-147.
109. Goh, F.G. and K.S. Midwood, *Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis*. Rheumatology, 2012: p. ker257.
110. Si, S., *discovery of VIP: initially looked for in the lung, isolated from intestine, and identified as a neuropeptide*. Peptides, 2007. **28**(9): p. 1620-1.
111. Said, S.I., *Vasoactive intestinal peptide*. Advances in metabolic disorders, 2013. **11**: p. 369-390.
112. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases*. Journal of molecular medicine, 2002. **80**(1): p. 16-24.
113. Rachdi, L., J.-C. Marie, and R. Scharfmann, *Role for VPAC2 receptor-mediated signals in pancreas development*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 85-92.
114. Fraccaroli, L., et al., *VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to trophoblast cells*. British journal of pharmacology, 2009. **156**(1): p. 116-126.
115. Perez Leiros, C. and R. Ramhorst, *Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides*. American journal of reproductive immunology, 2013. **69**(4): p. 359-368.
116. Cazillis, M.I., et al., *VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells*. European Journal of Neuroscience, 2004. **19**(4): p. 798-808.
117. Masmoudi-Kouki, O., et al., *Role of PACAP and VIP in astroglial functions*. Peptides, 2007. **28**(9): p. 1753-1760.
118. Couvineau, A. and M. Laburthe, *VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins*. British journal of pharmacology, 2012. **166**(1): p. 42-50.
119. Langer, I., *Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies*. Frontiers in endocrinology, 2012. **3**.
120. Chorny, A., et al., *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft-versus-host disease while maintaining the graft-versus-tumor response*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3787-3794.



121. Jimeno, R., et al., *Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells*. Immunology and cell biology, 2012. **90**(2): p. 178-186.
122. Delgado, M., et al., *Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease*. Nature medicine, 2001. **7**(5): p. 563-568.
123. Abad, C., et al., *Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 961-971.
124. Lodde, B.M., et al., *Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjögren's syndrome*. Annals of the rheumatic diseases, 2006. **65**(2): p. 195-200.
125. Burian, B., et al., *Clinical potential of VIP by modified pharmaco-kinetics and delivery mechanisms*. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders), 2012. **12**(4): p. 344-350.
126. Klippstein, R. and D. Pozo, *Chapter Five-Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Nanoparticles for Diagnostics and for Controlled and Targeted Drug Delivery*. Advances in protein chemistry and structural biology, 2015. **98**: p. 145-168.
127. Martínez, C., et al., *Serum Levels of Vasoactive Intestinal Peptide as a Prognostic Marker in Early Arthritis*. Plos One. **9**(1): p. e85248.
128. Seoane, I.V., et al., *Vasoactive Intestinal Peptide in Early Spondyloarthritis: Low Serum Levels as a Potential Biomarker for Disease Severity*. Journal of Molecular Neuroscience, 2015: p. 1-8.
129. Maria, O.M., et al., *Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2011. **43**(4): p. 622-631.
130. Yamamoto, H., et al., *Detection of Alterations in the Levels of Neuropeptides and Salivary Gland Responses in the Non-Obese Diabetic Mouse Model for Autoimmune Sialoadenitis*. Scandinavian journal of immunology, 1997. **45**(1): p. 55-61.
131. Rosignoli, F., et al., *Defective signalling in salivary glands precedes the autoimmune response in the non-obese diabetic mouse model of sialadenitis*. Clinical & Experimental Immunology, 2005. **142**(3): p. 411-418.
132. Shimizu, S., et al., *Involvement of toll-like receptors in autoimmune sialoadenitis of the non-obese diabetic mouse*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2012. **41**(7): p. 517-523.
133. Delaleu, N., et al., *Transcriptional landscapes of emerging autoimmunity: transient aberrations in the targeted tissue's extracellular milieu precede immune responses in Sjögren's syndrome*. Arthritis research & therapy, 2013. **15**(5): p. R174.
134. Shi, H., et al., *Activation of TLR9-dependent p38MAPK pathway in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome in NOD/Ltj mouse*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2014. **43**(10): p. 785-791.
135. Hauk, V., et al., *Vasoactive intestinal peptide/vasoactive intestinal peptide receptor relative expression in salivary glands as one endogenous modulator of acinar cell apoptosis in a murine model of Sjögren's syndrome*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **166**(3): p. 309-316.
136. Patel, V.N., I.T. Rebutini, and M.P. Hoffman, *Salivary gland branching morphogenesis*. Differentiation, 2006. **74**(7): p. 349-364.
137. Larocca, L., et al., *VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages*. International immunopharmacology, 2007. **7**(10): p. 1343-1349.

138. Herrera JL, G.-R.E., Fernandez-Montesinos R, Quintana FJ, Najmanovich R, Pozo D, *Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages*. J Cell Mol Med 2009. **13**.
139. Delgado M, M.-E.E., Kan Y, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE, Gomariz RP, Ganea D., *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 31427-31436.
140. Roescher, N., et al., *Temporal changes in salivary glands of non-obese diabetic mice as a model for Sjögren's syndrome*. Oral diseases, 2012. **18**(1): p. 96-106.
141. Rosignoli, F., et al., *Inhibition of calcium-calmodulin kinase restores nitric oxide production and signaling in submandibular glands of a mouse model of salivary dysfunction*. British journal of pharmacology, 2004. **143**(8): p. 1058-1065.
142. Del Fiacco, M., et al., *Effect of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine and substance P on human major salivary gland secretion*. Oral diseases, 2014.
143. Mansson, B., B.O. Nilsson, and J.r. Ekström, *Effects of repeated infusions of substance P and vasoactive intestinal peptide on the weights of salivary glands subjected to atrophying influences in rats*. British journal of pharmacology, 1990. **101**(4): p. 853-858.
144. Törnwall, J., et al., *Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and its binding sites in labial salivary glands in Sjogren's syndrome and in normal controls*. Clinical and experimental rheumatology, 1993. **12**(3): p. 287-292.
145. Strietzel FP, Lafaurie GI, and A.I. Mendoza GR, Pejda S, Vuletić L, Mantilla R, Falcão DP, Leal SC, Bezerra AC, Tran SD, Ménard HA, Kimoto S, Pan S, Martín-Granizo RA, Lozano ML, Zunt SL, Krushinski CA, Melilli D, Campisi G, Paderni C, Dolce S, Yepes JF, Lindh L, Koray M, Mumcu G, Elad S, Zeevi I, Barrios BC, López Sánchez RM, Beiski BZ, Wolff A, Kontinen YT., *Efficacy and safety of an intraoral electrostimulation device for xerostomia relief: a multicenter, randomized trial*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(1): p. 180-190.
146. Juarranz, Y., et al., *VIP Decreases TLR4 Expression Induced by LPS and TNF $\alpha$  Treatment in Human Synovial Fibroblasts*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1070**(1): p. 359-364.
147. Arranz, A., et al., *Effect of VIP on TLR2 and TLR4 Expression in Lymph Node Immune Cells During TNBS-Induced Colitis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1070**(1): p. 129-134.
148. Arranz, A., et al., *Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide*. Molecular immunology, 2008. **45**(10): p. 2970-2980.
149. Jiang, X., et al., *Vasoactive intestinal peptide downregulates proinflammatory TLRs while upregulating anti-inflammatory TLRs in the infected cornea*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(1): p. 269-278.
150. Jiang, W., et al. *Inhibition of Toll-like receptor 4 with vasoactive intestinal peptide attenuates liver ischemia-reperfusion injury*. in *Transplantation proceedings*. 2012: Elsevier.
151. Piccinini, A.M. and K.S. Midwood, *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling*. Mediators of inflammation, 2010. **2010**.
152. KIRIPOLSKY, J. and J.M. KRAMER, *Biglycan Induces TLR4 In Salivary Cells: Implications For Sjogren's Syndrome*. AADR Annual Meeting & Exhibition 2014, 2014.

153. Pérez Leirós, C., et al., *Activation of nitric oxide signaling through muscarinic receptors in submandibular glands by primary Sjögren's syndrome antibodies*. Clinical Immunology, 1999. **90**(2): p. 190-195.
154. Robinson, C.P., et al., *Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Ignull mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(13): p. 7538-7543.
155. Esch, T.R. and M.A. Taubman, *Autoantibodies in Salivary Hypofunction in the NOD Mousea*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **842**(1): p. 221-228.
156. Brown, T.R., et al., *Thyroid injury, autoantigen availability, and the initiation of autoimmune thyroiditis*. Autoimmunity, 1997. **27**(1): p. 1-12.
157. Enger, T.B., et al., *The Hippo signaling pathway is required for salivary gland development and its dysregulation is associated with Sjogren's syndrome*. Laboratory Investigation, 2013. **93**(11): p. 1203-1218.
158. Wang, D., et al., *Correlation between salivary secretion and salivary AQP5 levels in health and disease*. The Journal of Medical Investigation, 2009. **56**(Supplement): p. 350-353.
159. Steinfeld, S.D., T. Appelboom, and C. Delporte, *Treatment with infliximab restores normal aquaporin 5 distribution in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome*. Arthritis & Rheumatism, 2002. **46**(8): p. 2249-2251.
160. Woo, J., et al., *Overexpression of AQP5, a putative oncogene, promotes cell growth and transformation*. Cancer letters, 2008. **264**(1): p. 54-62.
161. Said, S.I., et al., *Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1260-1268.
162. Abad, C., et al., *VIP deficient mice exhibit resistance to lipopolysaccharide induced endotoxemia with an intrinsic defect in proinflammatory cellular responses*. Plos One, 2012. **7**(5): p. e36922.
163. Abad, C., et al., *Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(45): p. 19555-19560.
164. Gaipal US, V.R., Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M., *Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus*. Autoimmun Rev, 2005. **4**: p. 189-194.
165. Shao WH, C.P., *Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**: p. 202.
166. Tas SW, Q.P., Botto M, Fossati-Jimack L, *Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells* Ann Rheum Dis, 2006. **65**: p. 216-221.
167. Sule, S., et al., *Abnormal production of pro-and anti-inflammatory cytokines by lupus monocytes in response to apoptotic cells*. Plos One, 2011. **6**(3): p. e17495.
168. Fragoulis, G.E., et al., *Impaired degradation and aberrant phagocytosis of necrotic cell debris in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome*. Journal of autoimmunity, 2014.
169. Manoussakis, M.N., et al., *Impaired Clearance of Early Apoptotic Cells Mediated by Inhibitory IgG Antibodies in Patients with Primary Sjögren's Syndrome*. Plos One, 2014. **9**(11): p. e112100.
170. Wildenberg, M.E., et al., *Increased frequency of CD16+ monocytes and the presence of activated dendritic cells in salivary glands in primary Sjögren syndrome*. Annals of the rheumatic diseases, 2009. **68**(3): p. 420-426.
171. De La Fuente, M.n., et al., *Stimulation by vasoactive intestinal peptide (VIP) of phagocytic function in rat macrophages. Protein kinase C involvement*. Regulatory peptides, 1993. **48**(3): p. 345-353.

172. Song, M., et al., *VIP enhances phagocytosis of fibrillar beta-amyloid by microglia and attenuates amyloid deposition in the brain of APP/PS1 mice*. Plos One, 2012. **7**(2): p. e29790.
173. Ichinose, M., M. Sawada, and T. Maeno, *Inhibitory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on phagocytosis in mouse peritoneal macrophages*. Regulatory peptides, 1994. **54**(2): p. 457-466.
174. Couvineau, A. and M. Laburthe, *VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins*. Br J Pharmacol, 2011. **166**(1): p. 42-50.
175. Lara-Marquez, M.L., et al., *Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(4): p. 2522-2530.
176. Herrera, J.L., et al., *Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages*. Journal of cellular and molecular medicine, 2009. **13**(9b): p. 3209-3217.
177. Carrión M, J.Y., Pérez-García S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, *RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(1626-1636).
178. Juarranz, Y., et al., *Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts*. Arthr Rheum, 2008. **58**(4): p. 1086-95.
179. Ipp, H., et al., *CD4+ T cells in HIV infection show increased levels of expression of a receptor for vasoactive intestinal peptide, VPAC2*. Immunologic research, 2014. **60**(1): p. 11-15.
180. Pei, L., *Molecular cloning of a novel transcriptional repressor protein of the rat type 1 vasoactive intestinal peptide receptor gene*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(31): p. 19902-19908.
181. Dorsam, G. and E.J. Goetzl, *Vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VPAC-1) is a novel gene target of the hemolymphopoietic transcription factor Ikaros*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(16): p. 13488-13493.
182. Trembleau, S., et al., *Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice*. The Journal of experimental medicine, 1995. **181**(2): p. 817-821.
183. Goicovich, E., et al., *Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts*. Arthritis & Rheumatism, 2003. **48**(9): p. 2573-2584.