



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

# **“Caracterización de macrófagos de la cavidad peritoneal y su influencia en el Lupus Eritematoso sistémico (SLE)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**NICOLÁS ALEJANDRO VALDIVIESO BERRÍOS**

Directora Seminario de Título:

Doctora María Rosa Bono Merino

Codirectora Seminario de Título:

Doctora Gabriela Paola Tejon

Agosto 2019

Santiago - Chile

**Aunque se hace lo que se puede...**

**Esto es solo el principio!**

## BIOGRAFÍA



Nací en Santiago el 20 de septiembre de 1991, teniendo una infancia tranquila junto a mi papá, mamá y hermanas. Empecé mis estudios en el colegio Piamarta en donde me empezó a gustar el área de la biología. Con el apoyo de mis padres, entré al Instituto Nacional en donde conocí muy buenos amigos y me decanté definitivamente por la Biología, en especial por cómo funcionan los organismos vivos y como se desenvuelve la vida. Inicialmente quise estudiar medicina, pero luego de la PSU definitivamente entré al área científica. Ingrese a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular y posteriormente, la Dra. Bono me aceptó en el Laboratorio de Inmunología en donde he podido, con mucho esfuerzo y no sin vacilaciones, vincular mis ganas de contribuir al entendimiento del funcionamiento de lo vivo con el objetivo de ayudar dentro de la medicina. Este seminario de título es el primer paso de muchos más (eso espero hacer) que me ayuden a cumplir mi deseo de contribuir con un poco de conocimiento y, por, sobre todo, de ayudar a que se vaya relevando lo misterioso y desconocido.

Vamos viendo cómo se va dando...

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora María Rosa Bono por aceptarme en el Laboratorio y recibirme para poder realizar mi unidad de investigación. Así como también por apoyarme con muy buenas observaciones científicas y compartir conmigo como ve ella este mundillo científico al que me estoy metiendo.

Por supuesto que tiene un lugar especial en todo esto la Gaby. Ella me recibió y me ayudo a empezar el trabajo en el mesón, dónde las cosas son de verdad. Las cosas buenas que he podido hacer son gracias a que ella ha compartido su conocimiento conmigo, mostrándome su forma de hacer las cosas y permitiendo conformar un equipo de trabajo. Trate de seguir todas tus ideas, a veces fue difícil, pero espero poder haber contribuido en algo a lo que tenía planeado.

Agradecer también a la Dra. Sauma (la Dani) y al Dr. Roseblatt (Mario), que han contribuido en mi formación científica y también en los conocimientos que comparten semana a semana con nosotros en las reuniones de laboratorio. Agradezco pertenecer a este laboratorio, en donde he convivido este tiempo con personas maravillosas como Yessia, Sarah, Brian, Pedro, Justine, Vale, Eli, Gisselle y Óscar. Agradecer también a mi compadre Leo, que siempre está dispuesto a ayudar a todos los que lo necesiten, siempre con una sonrisa. A la Pame muchas gracias por ayudarnos con todo, siempre estás ahí cuando necesitamos algo y ayudas a que el laboratorio funcione.

Un lugar también especial en todo esto ocupan mi papá y mi mamá. Sin ellos claramente no estaría aquí, sino que también me han apoyado en las cosas que he intentado hacer. También mis hermanas, Paula y Tamara, quienes (a su modo) han servido de inspiración, escape y apoyo en la realización de esta tesis.

He recibido el apoyo de muchas personas que me han llevado a estar en este preciso momento, personas que me han desafiado a pensarme, a definirme, que me han

ayudado en momentos complejos y que me han hecho reír (bastante). Un abrazo y espero haberles retribuido en algo todo lo que me han dado hasta ahora, muchas gracias Nexo, Kathy, Pachi, Javi, Dani. También al Dani, la Tamara, el Howard, al Pap, a Luis Felipe, la Octavia, la Nati, al Camilo, al Santiago, al Gerardo, los otros biotecs con los que me sigo juntando, a mis amigos del Nacional que pronto nos veremos nuevamente (espero que independiente del año en que sea leído esto).

Soy muy afortunado, he recibido el apoyo de muchas personas importantes en mi vida y me han transformado. Pero les quiero pedir algo: Sigamos estando ahí para nosotros, sigamos compartiendo, apoyándonos y queriéndonos. Sigamos tratando de transformar este sistema capitalista opresor, para que más personas compartan, se apoyen y se quieran, pero que por sobre todo sigamos riendo a pesar de todo.

**Hasta la Victoria Siempre!**

*Agosto 2019*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|  |     |
|--|-----|
| BIOGRAFÍA .....                            | iii |
| AGRADECIMIENTOS .....                      | iv  |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                | x   |
| RESUMEN .....                              | 1   |
| ABSTRACT .....                             | 3   |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                       | 5   |
| Lupus Eritematoso Sistémico .....          | 5   |
| Macrófagos .....                           | 6   |
| Linfocitos B y Cavidad Peritoneal .....    | 10  |
| Linfocitos T y Cavidad Peritoneal .....    | 11  |
| Macrófagos, LT y LB en autoinmunidad ..... | 12  |
| Modelo murino de Lupus.....                | 13  |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....             | 14  |
| 2.1 Hipótesis .....                        | 14  |
| 2.2 Objetivo general .....                 | 14  |
| 2.3 Objetivos específicos .....            | 14  |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....              | 15  |
| 3.1 Materiales .....                       | 15  |
| 3.1.1. Animales.....                       | 15  |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.2. Anticuerpos .....   | 16 |
| 3.1.3 Otros reactivos .....  | 16 |
| 3.1.4 Equipos .....  | 16 |
| 3.1.5. Programas .....   | 17 |
| 3.2 Métodos.....   | 17 |
| 3.2.1. Obtención de células del peritoneo.....   | 17 |
| 3.2.2 Citometría de flujo de las células de la cavidad peritoneal .....                        | 17 |
| 3.2.3 Purificación de células del peritoneo mediante <i>Cell sorting</i> .....                 | 18 |
| 3.2.4 Cocultivo de linfocitos B con macrófagos .....   | 18 |
| 3.2.5 Análisis estadístico .....   | 20 |
| 4. RESULTADOS.....   | 21 |
| 4.1 Comparación de poblaciones inmunes en el peritoneo de ratones lúpicos y controles.....     | 21 |
| 4.1.1 Macrófagos.....  | 23 |
| 4.1.2 Linfocitos B .....   | 24 |
| 4.1.3 Linfocitos T .....   | 26 |
| 4.2 Fenotipo de los macrófagos peritoneales de ratones enfermos de lupus y ratones sanos ..... | 27 |
| 4.3 Cocultivo de linfocitos B controles y macrófagos peritoneales lúpicos y controles.....     | 29 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| <b>5. DISCUSIÓN</b> .....          | 32 |
| <b>6. RESUMEN RESULTADOS</b> ..... | 39 |
| <b>7. CONCLUSIONES</b> .....       | 40 |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....       | 41 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Estrategia de análisis de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal.   | 22 |
| Figura 2: El peritoneo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de macrófagos en comparación a ratones controles.  | 23 |
| Figura 3: El peritoneo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de linfocitos B1a pero un menor porcentaje de linfocitos B totales en comparación a ratones controles. | 25 |
| Figura 4: Análisis de linfocitos T de la cavidad peritoneal.  | 27 |
| Figura 5: Los macrófagos peritoneales de ratones lúpicos tienen un fenotipo que se aleja del perfil M2.   | 29 |
| Figura 6: Los Macrófagos de la cavidad peritoneal suprimen la proliferación de linfocitos B en presencia de LPS.  | 30 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| ADN:    | Ácido desoxirribonucleico  |
| ANA:    | Anticuerpo antinuclear   |
| APC:    | Célula Presentadora de Antígenos ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )                        |
| ARN:    | Ácido Ribonucleico   |
| ATP:    | Adenosín trifosfato  |
| BCR:    | Receptor del linfocito B ( <i>B-cell Receptor</i> )  |
| BMDM:   | Macrófagos derivados de médula Ósea ( <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i> )             |
| CCL13:  | Quimioquina Ligando 13 ( <i>Chemokine C-C motif ligand 13</i> )                            |
| CFSE:   | Éster de succinimidil-carboxifluoresceína ( <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> ) |
| ELISA:  | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> ) |
| FBS:    | Suero Fetal Bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )   |
| FITC:   | Isotionato de Fluoresceína ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )                           |
| IFN:    | Interferón   |
| Ig:     | Inmunoglobulina  |
| IL:     | Interleuquina  |
| LB:     | Linfocito B  |
| LES:    | Lupus Eritematoso Sistémico  |
| LPS:    | Lipopolisacárido   |
| LT:     | Linfocito T  |
| MHC-II: | Molécula de Histocompatibilidad de Clase II  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| NZB:            | <i>New Zealand Black</i>   |
| NZB/W F1:       | Cruza entre ratones NZB hembra y NZW macho                                     |
| NZW:            | <i>New Zealand White</i>   |
| PBS:            | Tampón Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )                       |
| PE:             | Ficoeritrina ( <i>Phycoerythrin</i> )  |
| PI:             | Yoduro de propidio ( <i>Propidium Iodide</i> )                                 |
| RBC:            | Tampón de Lisis de Glóbulos Rojos ( <i>Red Blood Cell Lysis buffer</i> )       |
| RPMI:           | Medio de Cultivo ( <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> )             |
| SLEDAI:         | Índice de actividad de la enfermedad LES ( <i>SLE Disease Activity Index</i> ) |
| TCD4:           | Linfocito T CD4  |
| TCD8:           | Linfocito T CD8  |
| TCR:            | Receptor para el antígeno del linfocito T ( <i>T-cell Receptor</i> )           |
| TGF- $\beta$ :  | <i>Transforming Growth Factor beta</i>   |
| TLR:            | Receptor de Tipo Toll ( <i>Toll-Like Receptor</i> )                            |
| TNF- $\alpha$ : | <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>   |

## RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la hiperactividad de células T y B autorreactivas, la producción de autoanticuerpos y la formación de complejos inmunes que terminan desencadenando daño sistémico. La hiperactividad está mediada por la presentación de antígenos propios, por las células presentadoras de antígenos (APC) como las células dendríticas y los macrófagos. La principal función de los macrófagos es la fagocitosis de patógenos o células apoptóticas y la secreción de citoquinas y quimioquinas que influyen directamente en la respuesta inmune. Anormalidades en la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos han sido relacionadas con varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo el Lupus. En la cavidad peritoneal, las poblaciones más numerosas de células del sistema inmune son los macrófagos y los linfocitos B. Estos últimos producen autoanticuerpos y están relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el Lupus. En base a estos antecedentes, en este seminario se estudió la interacción entre macrófagos y linfocitos B de la cavidad peritoneal, en ratones enfermos de Lupus y se compararon los resultados con ratones controles sanos. Para esto, analizamos la frecuencia de macrófagos, linfocitos B y linfocitos T de la cavidad peritoneal en el modelo murino de Lupus, NZB/W F1. Mediante análisis de citometría de flujo observamos un aumento significativo en la frecuencia de macrófagos y linfocitos T CD4, y una frecuencia significativamente menor de linfocitos B totales en la cavidad peritoneal de ratones enfermos en comparación con ratones controles. Además, observamos que los macrófagos peritoneales de los ratones enfermos tienen una menor expresión del receptor de manosa CD206 comparado a los ratones controles, dando cuenta de un fenotipo que se alejaría del perfil M2 antiinflamatorio.

Por otro parte, la mayor parte de los linfocitos B presentes en el peritoneo de los ratones lúpicos corresponden al fenotipo B1. Con el objetivo de estudiar la interacción entre macrófagos y linfocitos B, realizamos experimentos de cocultivo entre linfocitos B peritoneales de ratones controles y macrófagos peritoneales de ratones controles o lúpicos en presencia de LPS. En estas condiciones se produce la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células preplasmáticas. Nuestros resultados muestran que los macrófagos de ratones lúpicos producen una menor proliferación y diferenciación de los linfocitos B.

En conclusión, en este trabajo mostramos que existen alteraciones en la frecuencia, fenotipo y función de los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal durante el desarrollo del Lupus. Estas observaciones sugieren que los macrófagos peritoneales tendrían un rol relevante en el desarrollo del Lupus.

## **ABSTRACT**

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the hyperactivity of autoreactive T and B cells, the production of autoantibodies and, the formation of immune complexes. Hyperactivity is mediated by the presentation of self-antigens by antigen-presenting cells (APC) such as dendritic cells and macrophages. The primary function of macrophages in the phagocytosis of pathogens or apoptotic cells and the secretion of cytokines and chemokines that directly influence the immune response. Abnormalities in the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages have been linked to several autoimmune and inflammatory diseases, including Lupus. In the peritoneal cavity, the most numerous populations of immune system cells are macrophages and B lymphocytes. The latter produces autoantibodies and has been related to autoimmune disease development such as Lupus. Based on this background, in this work was study the interaction between macrophages and B lymphocytes in the peritoneal cavity of diseased mice and compare then with healthy control mice. For this, we analyzed the frequency of macrophages, B lymphocytes, and T lymphocytes in the peritoneal cavity of a murine model of Lupus NZB/W F1. Using Flow cytometry, we observed a significant increase in the frequency of macrophages and CD4 T lymphocytes while B lymphocytes presented a significantly lower frequency in the peritoneal cavity of diseased mice when compared to control mice. Besides, we observed that peritoneal macrophages of diseased mice have a lower expression of the mannose receptor CD206 compare to control, suggesting a phenotype that would move away from the classic M2 anti-inflammatory profile.

On the other hand, most of the B lymphocytes present in the peritoneum of lupus mice correspond to the B1 phenotype. In order to study the interaction between macrophage and B lymphocytes, we performed co-culture experiments between peritoneal B lymphocytes of

control mice and peritoneal macrophages from control or lupus mice in the presence of LPS. Under these conditions, proliferation and differentiation of B lymphocytes to plasma cells occur. Our results show that macrophages of lupus mice produce less proliferation and differentiation of B lymphocytes.

In conclusion, we show that exists alterations in the frequency, phenotype, and function of the macrophages present in the peritoneal cavity during the development of Lupus. These findings suggest that peritoneal macrophages would have an important role in Lupus development.

## 1. INTRODUCCIÓN

### Lupus Eritematoso Sistémico

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multisistémica, fatal y crónica. Se desarrolla con una prevalencia del 90% de los casos en mujeres en edad fértil, disminuyendo su incidencia al iniciar la menopausia. Se caracteriza por un curso cíclico con remisiones y recaídas de duraciones variables. Sus manifestaciones clínicas van desde afecciones leves como decaimiento, artritis, dermatitis, a otras muy graves o fatales, como por ejemplo compromiso renal, nervioso y circulatorio. El Lupus se presenta con una amplia variedad de sintomatologías, haciendo que no exista un criterio único de diagnóstico y se deban utilizar una suma de criterios independientes que constituyen la escala *SLE Disease Activity Index* (SLEDAI) que permite identificar el nivel de actividad que presenta la enfermedad en el paciente (Amur y col., 2012; Gatto y col., 2018; Kaul y col., 2016; MINSAL, 2013).

A nivel inmunológico, el Lupus se caracteriza por la hiperactividad de linfocitos T y linfocitos B autorreactivos, teniendo como principal característica la acumulación de autoanticuerpos contra componentes del núcleo celular, conocidos como ANAs (anticuerpos antinucleares). Estos anticuerpos pueden reconocer diferentes estructuras como nucleosomas, histonas, proteínas no histonas asociadas a ADN, proteínas asociadas al ARN, entre otros componentes (Gatto y col., 2018; Kaul y col., 2016; Lipsky, 2001; Sang y col., 2014). Estos anticuerpos de alta afinidad, al unirse a sus autoantígenos forman complejos inmunes que se depositan en diversos órganos y tejidos desencadenando el daño tisular característico del Lupus. El depósito de estos complejos activa el sistema del complemento y reclutan otras células inmunes, amplificando el daño inicial del tejido. En el caso del riñón, se observa daño en la membrana basal denominado glomerulonefritis o nefritis lúpica, caracterizado por la deposición inicial de complejos mediados por IgG y



proteínas del complemento, derivando en la liberación de proteínas en la orina, denominado proteinuria (Davidson, 2016; Kaul y col., 2016).

La etiología del LES es desconocida, sin embargo, se asocian factores de riesgo genéticos, epigenéticos, hormonales, características de la microbiota y factores ambientales, sin que exista hasta ahora conocimiento acabado de como interactúan estos elementos que darían cuenta de la predisposición a sufrir esta enfermedad autoinmune (Kaul y col., 2016; Patel & Richardson, 2010). Actualmente, los tratamientos para el LES consideran el uso de anticuerpos que eliminan linfocitos B o el uso de antiinflamatorios e inmunosupresores que regulan la respuesta inmune. Sin embargo, estos tratamientos son solo paliativos y el Lupus continua siendo una enfermedad para la que aún no existe cura (Gatto y col., 2018; MINSAL, 2013).

## **Macrófagos**

Los macrófagos son células del sistema inmune innato capaces de reconocer a través de receptores en su superficie una amplia variedad de patrones moleculares y organizar la respuesta apropiada para mantener la homeostasis de los órganos o tejidos donde se encuentran. Su función principal es fagocitar patógenos o células apoptóticas y la presentación de antígenos a los linfocitos T y, en menor medida, a los linfocitos B (Murray & Wynn, 2011). Por otro lado, los macrófagos presentan en la superficie receptores de citoquinas y quimioquinas, al mismo tiempo que ellos mismos son capaces de producirlas, lo que los faculta para reconocer diferentes señales del microambiente e interactuar con otras células del sistema inmune (Murray & Wynn, 2011).

En el estudio de los macrófagos, se han utilizado principalmente macrófagos diferenciados a partir de progenitores en la médula ósea, denominándolos macrófagos derivados de médula ósea o *Bone Marrow-Derived Macrophages* (BMDM). Estos macrófagos generados "*in vitro*" en presencia de distintos estímulos han permitido

establecer la existencia de diferentes subpoblaciones caracterizadas por funciones específicas, la expresión diferencial de genes y un distinto estado de activación. Los macrófagos clásicamente activados o M1 se caracterizan por la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 y especies reactivas de oxígeno, cuentan con alta expresión de moléculas presentadoras de antígenos MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86 permitiendo activar la función efectora de linfocitos T vírgenes (Tsunematsu y col., 2017). Los macrófagos activados alternativamente o M2 se caracterizan por producir bajos niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-12) y altos niveles de citoquinas antiinflamatorias (IL-10), cumpliendo funciones de inmunosupresión y contribuyen a la remodelación de tejidos (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2012). Sin embargo, al analizar los macrófagos *in vivo*, es posible observar que existen diferentes grados de activación, observándose un espectro amplio que transita entre el fenotipo inflamatorio y antiinflamatorio (Mantovani y col., 2013; Mosser & Edwards, 2008).

Inicialmente se describió que los macrófagos que se encuentran en los tejidos se originan a partir de monocitos que migran desde la circulación sanguínea atraídos por quimioquinas producidas en el sitio de infección o daño (Abbas y col., 2012). Sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de macrófagos que tienen un origen embrionario no hematopoyético con capacidad de autorrenovarse en el mismo sitio (Ginhoux y col., 2010; Schulz y col., 2012). Estos macrófagos se han identificado en varios tejidos y se han denominados “macrófagos residentes de tejido”. Estos macrófagos tienen roles importantes en la limpieza (degradación de eritrocitos senescentes, células apoptóticas y líquidos pulmonares), en el desarrollo (degradación del hueso y angiogénesis) y la regulación del metabolismo (regulación de la sensibilidad a insulina y de la termogénesis adaptativa en tejido adiposo) (Davies y col., 2013). Adicionalmente, en cada uno de los tejidos en donde se encuentran tendrían un rol como centinela inmunológico iniciando la respuesta inmune,

eliminando el debris celular resultante de la respuesta inmune y restableciendo la homeostasis microambiental de los tejidos (Davies y col. 2013, 2017).

La correcta eliminación de las células apoptóticas por parte de los macrófagos previene que durante la destrucción celular se liberen mediadores proinflamatorios desencadenando una reacción inmune en contra de células propias. Durante la apoptosis, las células liberan ATP y otras moléculas del citoplasma que actúan como señales que difunden para atraer macrófagos de los tejidos circundantes (señales “find-me” o “encuéntrame”) (Ravichandran, 2010). Adicionalmente, las células apoptóticas exponen en su superficie fosfatidilserinas que normalmente se encuentran en la cara citoplasmática de su membrana, dando una señal de reconocimiento positiva denominada “eat-me” o “cómeme” (Ravichandran, 2010). Por otro lado, las células que no se encuentran en procesos apoptóticos presentan en su superficie la señal denominada “don’t-eat-me” o “no me comas” que corresponde a la proteína CD47, reconocida por el receptor CD172a o SIRP $\alpha$  de los macrófagos. Esta señal, es capaz de inhibir la eliminación de células incluso en la presencia de fosfatidilserinas en la superficie celular (Ravichandran, 2010). Se ha propuesto, que los macrófagos residentes en los tejidos se encuentran programados para una respuesta no inflamatoria al momento de realizar la eliminación de las células apoptóticas, por lo que producirían principalmente moléculas antiinflamatorias como TGF- $\beta$ , IL-10 y prostaglandina E2. Adicionalmente, carecerían de los receptores TLR capaces de reconocer ácidos nucleicos (TLR7 y TLR9) (Hochreiter-hufford & Ravichandran, 2013; Roberts y col., 2017).

La fagocitosis deficiente ha sido asociada a enfermedades autoinmunes como el Lupus. Se ha propuesto que el contenido nuclear liberado debido a la eliminación deficiente de las células apoptóticas es capaz de desencadenar la liberación de Interferón de tipo I, activando una respuesta inflamatoria de linfocitos B y T (Gaipl y col., 2007; Muñoz y col., 2010). Aumentos de los niveles plasmáticos de Interferón de tipo I en pacientes de Lupus

se han relacionado con el nivel de actividad de la enfermedad (SLEDAI) (Banchereau y col., 2016; Celhar & Fairhurst, 2017; Kaul y col., 2016).

### **Macrófagos y Cavity Peritoneal**

La cavity peritoneal se encuentra delimitada por el mesotelio de la pared abdominal (peritoneo parietal) y su equivalente en cada uno de los órganos del abdomen (peritoneo visceral). Su principal función es facilitar el movimiento de los órganos intraabdominales y es importante para la regulación de las respuestas inflamatorias, intercambio de fluidos y la prevención de fibrosis en el abdomen. Alteraciones en estos mecanismos pueden iniciar ascitis, la generación de adhesiones fibróticas, peritonitis y carcinomas peritoneales (Baal y col., 2017). Las poblaciones más abundantes presentes en esta cavity son los macrófagos y linfocitos B. (Bain & Jenkins, 2018; A. A. Cassado y col., 2015; Ghosn y col., 2010).

Se ha reportado que, luego de una lesión de los órganos viscerales como el hígado, un reservorio de macrófagos peritoneales es capaz de infiltrar el tejido lesionado sin la necesidad de pasar por vía circulatoria, siendo una respuesta más rápida para eliminar el tejido lesionado que los monocitos reclutados de la sangre, contribuyendo de este modo en su reparación (Wang & Kubes, 2016). Esta interacción de los macrófagos peritoneales con órganos viscerales como el hígado sugiere que los macrófagos peritoneales podrían tener un rol importante en enfermedades multisistémicas como el Lupus, pudiendo contribuir a la respuesta inmune local en distintos órganos.

Dentro del estudio de las enfermedades autoinmunes, se utiliza un modelo de enfermedad que se basa en las interacciones iniciadas en la cavity peritoneal. La inyección de pristano, un aceite orgánico de cadena larga es capaz de desencadenar una serie de síntomas autoinmunes, incluyendo la producción de autoanticuerpos y glomerulonefritis dependiente de interferón (Reeves y col., 2009). Este modelo ha permitido

entender que señales existentes en la cavidad peritoneal son capaces de generar fenómenos asociados al Lupus, por lo cual estudios de la interacción de las distintas poblaciones en la cavidad peritoneal cobran relevancia en el contexto de esta enfermedad autoinmune.

### **Linfocitos B y Cavidad Peritoneal**

Los linfocitos B son los responsables de la producción de anticuerpos en la respuesta inmune humoral. Es por ello, que se ha estudiado su rol como detonantes de enfermedades autoinmunes, en donde los autoanticuerpos secretados por linfocitos B autorreactivos son capaces de unirse con alta afinidad a su blanco, que en el caso del Lupus y otras enfermedades autoinmunes es generalmente ADN (Abbas y col., 2012; Davidson, 2016; Kaul y col., 2016; Sang y col., 2014).

Dentro de la cavidad peritoneal los linfocitos B constituyen la población más numerosa de células del sistema inmune. Se identifican dos tipos, los linfocitos B1 y los B2. Los linfocitos B1 se encuentran mayoritariamente en las cavidades pleurales, en especial en el peritoneo, mientras que los linfocitos B2 son los linfocitos convencionales, principalmente reconocidos en la zona marginal del bazo. Los linfocitos B1 secretan de manera espontánea anticuerpos de tipo IgM, denominados anticuerpos naturales (Ochsenbein y col., 1999). Esta clase de anticuerpos se encuentran significativamente aumentados en el modelo murino de Lupus NZB/W F1, sugiriendo su nexo con algunas enfermedades autoinmunes (Hayakawa y col., 1986; 1983). Estudios en ratones utilizando citometría de flujo han permitido identificar una subpoblación de linfocitos B1, denominados B1a, que se caracteriza por la expresión de CD5 que actúa como modulador del BCR, por otro lado, los que carecen de este marcador se denominan B1b (Baumgarth, 2010). Proporcionalmente, los linfocitos B1b son una pequeña fracción de los linfocitos B1 por lo cual los resultados obtenidos antes de identificar esta segunda población se deberían

principalmente a respuestas e interacciones de los linfocitos B1a (Duan & Morel, 2006; Goldman y col., 2017).

En estudios que muestran la interacción macrófago/Linfocito B, se ha descrito que los linfocitos B1 peritoneales son capaces de influir en la polarización de macrófagos asociados a tumores disminuyendo la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y CCL3 pero aumentando la expresión de IL-10 y marcadores asociados a fenotipo antiinflamatorio (S. Wong y col., 2010). También se ha propuesto que la IL-6 secretada por los macrófagos peritoneales regula la cantidad de linfocitos B1 en el peritoneo (Thies y col., 2013). Adicionalmente, los macrófagos serían los responsables de producir las quimioquinas que retienen a los linfocitos B1 en la cavidad peritoneal, principalmente CXCL13 (conocida también como BCL, *B cell chemoattractant*) que se une al receptor CXCR5 el cual está ampliamente presente en los linfocitos B1a (Ansel, Harris, & Cyster, 2002; Ito y col., 2004).

### **Linfocitos T y Cavidad Peritoneal**

Los linfocitos T juegan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa. La estructura del receptor heterodimérico *T-cell receptor* (TCR) le confiere la especificidad antigénica al linfocito T donde el complejo CD3 es necesario para la señalización de este receptor. Las células T se dividen en dos grupos de linfocitos que expresan de manera mutuamente excluyente los correceptores CD4 o CD8, cuya función es estabilizar la unión MHC-péptido-TCR durante la activación del linfocito T. Los linfocitos T que expresan CD4, denominados TCD4, tienen como principal función regular otras células del sistema inmune mediante la secreción de citoquinas o el contacto célula a célula. En cambio, los linfocitos que expresan CD8 se denominan TCD8 y son capaces de convertirse en células citotóxicas efectoras que reconocen y eliminan células blanco (Abbas y col., 2012).

Debido a su función como reguladores de la respuesta inmune humoral, los linfocitos T han sido ampliamente estudiados en enfermedades autoinmunes. En una revisión de

Suárez-Fueyo y col., se analiza su rol en el Lupus. Principalmente se observa que, en pacientes con esta enfermedad, los linfocitos T autorreactivos no son oportunamente eliminados y son capaces de proporcionar ayuda a células B autorreactivas para producir autoanticuerpos de alta afinidad que derivan en el daño tisular típico de esta enfermedad. (Suárez-Fueyo y col., 2016).

### **Macrófagos, LT y LB en autoinmunidad**

Los tres tipos celulares previamente presentados serían los principales responsables de la autoinmunidad, al agruparse en lo que se ha denominado “loop inflamatorio” (Shlomchik, Craft, & Mamula, 2001): La limpieza deficiente de las células apoptóticas por parte de los macrófagos permitiría la existencia de remanentes apoptóticos que finalmente son presentados a linfocitos T autorreactivos que son capaces de activar a linfocitos B autorreactivos. Estos linfocitos B secretan autoanticuerpos que forman inmunocomplejos que se depositan en diferentes tejidos. La respuesta humoral, con acción del sistema del complemento y la formación de inmunocomplejos contribuye a un ambiente inflamatorio mediado por citoquinas y por el reclutamiento de células dendríticas, monocitos y macrófagos que promueven la inflamación del tejido. El daño tisular contribuye a la liberación de autoantígenos al aumentar las células que entran en apoptosis y que desarrollan necrosis secundaria. Estos eventos, promueven la disponibilidad de autoantígenos que son capaces de activar a los linfocitos T y B autorreactivos dando cuenta del desarrollo de la enfermedad (Muñoz y col., 2010; Shlomchik y col., 2001).

Al convivir estas tres poblaciones en el peritoneo y dada la importancia de los linfocitos B peritoneales en el desarrollo del Lupus, resulta relevante estudiar la interacción de estas poblaciones y el rol que tienen los macrófagos peritoneales en el inicio, desarrollo y mantención del Lupus eritematoso sistémico.

## **Modelo murino de Lupus**

Con el objetivo de estudiar el origen y el desarrollo de las enfermedades autoinmunes se han desarrollado diferentes modelos murinos que buscan recapitular la sintomatología observada en estas enfermedades. Específicamente, en el Lupus existen varios modelos de desarrollo espontaneo destacando el modelo NZB/W F1. Este modelo proviene de la primera descendencia de la cruce entre hembras NZB (*New Zealand Black*) con machos NZW (*New Zealand White*). Entre sus características destaca por ser el modelo que más se asemeja a la enfermedad en humanos. Se caracterizan por la producción de anticuerpos nucleares y el desarrollo de daño renal fatal, evidenciado por alta proteinuria. Este modelo, recapitula la prevalencia de la enfermedad en hembras que existe en humanos, presentándose a los 9 meses en el 90% de las hembras, mientras que en machos la enfermedad solo se presenta a partir de los 15 meses en una tasa mucho menor (Dixon et al., 1978; Perry, Sang, Yin, Zheng, & Morel, 2011). Dadas estas características, en este trabajo utilizaremos hembras de este modelo murino de la enfermedad.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

Los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal de ratones NZB/W F1 susceptibles de desarrollar Lupus poseen alteraciones fenotípicas y funcionales que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

### **2.2 Objetivo general**

Estudiar la función de los macrófagos de la cavidad peritoneal en el desarrollo del Lupus.

### **2.3 Objetivos específicos**

2.3.1 Identificar los macrófagos y las otras células inmunes presentes en la cavidad peritoneal en un modelo murino de Lupus y compararlas con las células presentes en los animales que aún no desarrollan la enfermedad y animales controles.

2.3.2 Comparar el fenotipo de los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal de ratones enfermos de Lupus, ratones que aún no desarrollan la enfermedad y ratones controles.

2.3.3 Evaluar el efecto de los macrófagos provenientes del peritoneo de ratones enfermos de Lupus y ratones controles sobre la diferenciación y proliferación de linfocitos B peritoneales.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1. Animales**

Ratones hembras de la cepa [NZBxNZW]F1, denominada en este seminario como NZB/W F1 y ratones NZW se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Para los experimentos se utilizaron ratones hembras NZB/W F1 y ratones controles de la cruce no-autoinmune [NZWxBALB/c] F1 de 3 a 10 meses de edad. Se elige esta cruce como controles debido a que poseen el mismo haplotipo H-2 del MHC (H-2<sup>dxz</sup>). La enfermedad en los ratones lúpicos fue evaluada mediante análisis de proteinuria medida de forma semicuantitativa utilizando tiras reactivas Combur Test N (Roche Diagnostics, Alemania) en conjunto con un análisis en el suero de anticuerpos antiADN de doble hebra mediante un ensayo convencional de ELISA. Los ratones son considerados lúpicos cuando muestran 500 mg/dL de proteinuria durante 3 semanas consecutivas después de lo cual son animales son eutanasiados. Los ratones de los grupos controles corresponden a hembras [NZWxBALB/c] F1 de la misma edad de los analizados en el grupo NZB/W F1. Los ratones prelúpicos corresponden a animales de la cepa NZB/W F1 que no desarrollan aún síntomas de la enfermedad medibles en suero y en la orina.

La mantención de los ratones se realizó bajo condiciones de esterilidad en el bioterio de la Fundación Ciencia & vida (Santiago, Chile) siguiendo los protocolos bioéticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y de la misma Fundación Ciencia & vida. Los animales fueron sacrificados mediante exposición prolongada y controlada a dióxido de carbono.

### **3.1.2. Anticuerpos**

Los anticuerpos monoclonales usados para el análisis por citometría de flujo y cell sorter adquiridos de Biolegend (San Diego, USA) fueron los siguientes: B220 APC (clon RA3-6B2), CD11b PE (clon M1-70), CD138 PE (clon 281-2), CD19 FITC (clon 6D5), CD19 BV421 (clon C068c2), CD206 PE-Cy7 (clon C068c2), CD4 PE (clon RM4-5), CD5 PE-Cy7 (clon 53-7.3), CD8a Ly-2 APC/Fire 750 (clon 53-6.7), F4/80 APC-Cy7 (clonBM8), F4/80 APC (clon BM9), IA-d Alexa Fluor 647 (clon 39-10-8), SIRP $\alpha$  APC (clon 15-414). De ebioscience se utilizó CD3 eFlour 660 (clon 17A2) y SIRP $\alpha$  (clon P84). Para bloquear los receptores FC se usó CD16/32 de Biolegend (clon 93).

Para la activación de linfocitos B se utilizó anti-CD40 ( $\alpha$ -CD40) puro (clon 1C10) e IL-4 de Biolegend.

Para determinar viabilidad se utilizó Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience) y yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich, USA). Para determinar la viabilidad en el microscopio se utilizó Azul de Tripán.

### **3.1.3 Otros reactivos**

Medios: Tampón fosfato salino PBS, RPMI-1640, penicilina, estreptomina, B-mercaptoetanol, fungizona, CFSE.

### **3.1.4 Equipos**

Cell sorter BD FACSAria™ III, BD Biosciences, California USA.

Citómetro de flujo FACSCanto II, BD Biosciences, California USA.

Centrífuga 5804 R, Eppendorf.

Centrífuga 5402 R, Eppendorf.

Incubador de CO<sub>2</sub> Serie 8000 WJ, Thermo Scientific, USA.

Microscopio Óptico Labophot-2, Nikon, USA.

### **3.1.5. Programas**

BD FACSDiva v.6.1.3, BD Biosciences, California USA.

BD FACSDiva v.7.1.3, BD Biosciences, California USA.

FlowJo v8.8.6, Tree Star, Inc., Trustees of Leland Stanford, Oregon USA.

GraphPad Prism 7.04, GraphPad software, San Diego, California USA.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1. Obtención de células del peritoneo**

Para la obtención de células del peritoneo se inyectan 10 mL de PBS en la cavidad peritoneal usando una jeringa estéril de 10 mL con aguja de 25 G. El volumen de PBS inyectado, luego de ser distribuido por la cavidad con masajes suaves, es recuperado utilizando la misma jeringa con aguja de 21 G. Adicionalmente, se realizan dos lavados del peritoneo con 2 a 3 mL de Verseno 2% FBS con micropipetas. La suspensión celular se centrifuga a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Se realiza lisis de glóbulos rojos añadiendo al pellet 1 ml de buffer RBC (Biolegend) e incubando en hielo 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 5 mL de RPMI 1640 10% FBS para detener la reacción y se centrifuga a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Las células son resuspendidas en un volumen conocido de RPMI 1640 10% FBS para determinar su número. Una alícuota de 10 µL de suspensión celular se diluye con un volumen igual de azul de tripán para descartar las células muertas al observar y contabilizar en el microscopio. El resto de la suspensión celular se utiliza para el análisis por citometría de flujo o *cell sorting*.

### **3.2.2 Citometría de flujo de las células de la cavidad peritoneal**

La suspensión celular obtenida en métodos 3.2.1 se distribuye para realizar el marcaje de las proteínas a analizar mediante citometría de flujo. Las células son resuspendidas en 50 µL de verseno 2% FBS con el anticuerpo CD16/32 como bloqueador

de receptores FcRγII/III e incubadas en hielo por 10 minutos. Al cabo de ese tiempo, se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos en verseno 2% FBS durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Las células fueron lavadas con 500 µL de verseno 2% FBS para eliminar el exceso de anticuerpos, centrifugando por 7 minutos a 600 x g a 4°C. Las células son resuspendidas en 300 µL de verseno 2% FBS para ser analizadas en el citómetro. Las células muertas fueron descartadas utilizando yoduro de propidio (PI). Para distinguir las células autofluorescentes de las que expresan bajos niveles individuales de los marcadores, se realizaron los controles correspondientes (*fluorescence-minus-one* o fluorescencia menos uno), en donde el anticuerpo en un canal de interés es omitido.

### **3.2.3 Purificación de células del peritoneo mediante *Cell sorting***

Macrófagos y linfocitos B obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones NZB/W F1 enfermos de Lupus y ratones NZW/Balb-c controles, fueron purificados mediante cell sorting. Las células obtenidas como se describe en métodos 3.2.1, fueron marcadas utilizando anti CD19 BV421, CD11b PE y F4/80 APC para distinguir a ambas poblaciones celulares: Macrófagos (F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD19<sup>-</sup>) y los linfocitos B definidos como (CD11b<sup>int</sup>, F4/80<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>). Para realizar el cell sorter, la suspensión de células peritoneales se resuspende en 3 mL de RPMI 10% FBS, y las células se separan en el sorter a una velocidad aproximada de 3.000 eventos por segundo, utilizando el nozzle de 100 µm.

### **3.2.4 Cocultivo de linfocitos B con macrófagos**

Se utilizaron células provenientes de ratones controles o lúpicos de la misma edad para realizar los cocultivos. Las células purificadas mediante *cell sorter* fueron descontaminadas con RPMI suplementado con Penicilina 300 U/mL y Estreptomicina 0,3 mg/mL por 2 minutos, luego se lavaron con RPMI + 10% FBS y centrifugaron a 600 x g por 7 min a 4°C. Posteriormente, los macrófagos fueron resuspendidos en medio de cultivo

RPMI 10% FBS +  $\beta$ -Mercaptoetanol 0,055  $\mu$ M + Fungizona 0,5  $\mu$ g/mL. La concentración de macrófagos fue ajustada a 400.000 células por mL para poner 50  $\mu$ L de la suspensión celular por pozo (20.000 macrófagos) en placa P96 fondo plano.

Los linfocitos B controles obtenidos por *cell sorter* fueron descontaminados de la misma forma que los macrófagos. Luego de centrifugar, fueron resuspendidos en PBS para ser marcados con Éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Para esto, se ajustó la concentración a  $10 \times 10^6$  células por mL y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave con una concentración final de 5  $\mu$ M de CFSE. Luego, se agregó un volumen equivalente de suero fetal bovino e incubó por un minuto a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 10 ml de RPMI 10% FBS y centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Finalmente, se resuspendieron en un volumen conocido de RPMI + 10% FBS y se ajustó su concentración a 2 millones de linfocitos B marcados con CFSE por mL. Se plaquearon en la placa P96 50  $\mu$ L (100.000) de Linfocitos B por pozo.

Los estímulos utilizados fueron LPS, CpG y  $\alpha$ -CD40 + IL-4. El Lipopolisacárido LPS utilizado proviene de *E. coli* y se utilizó a una concentración final de 2 ng/mL. En el caso de CpG se utilizó la variante ODN 1826 que activa fuertemente las células B, pero débilmente la producción de IFN $\alpha$  por parte de las células dendríticas. La concentración final fue de 1  $\mu$ g/mL. Para la estimulación con  $\alpha$ -CD40 + IL-4 se utilizó una concentración de 2  $\mu$ g/mL para  $\alpha$ -CD40 y 2 ng/mL para la IL-4. Cada estímulo fue añadido para obtener un volumen final por pozo de 200  $\mu$ L. Las células se incubaron por 4 días a 37°C con una atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>.

Transcurridos los 4 días, se recuperaron las células, se contaron y luego de centrifugar el sobrenadante se almacenó a -80°C. Las células recuperadas fueron marcadas en su superficie con Viability Dye en APC-H7, CD19 en APC y CD138 en PE. Los ciclos de proliferación se analizaron por citometría de flujo mediante la dilución en el colorante fluorescente CFSE.

### **3.2.5 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graph Pad Prism v7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos entre ratones controles, prelúpicos y lúpicos fueron analizados de a pares con un t-test no pareado tras la verificación, mediante la prueba Shapiro-wilk de que siguieran una distribución gaussiana normal. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se utilizó un t-test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. Todos los análisis se realizaron con un intervalo de confianza del 95%. Las significancias se determinaron según los valores de P como no significativo (ns):  $P > 0.05$ , significativos: \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

## 4. RESULTADOS

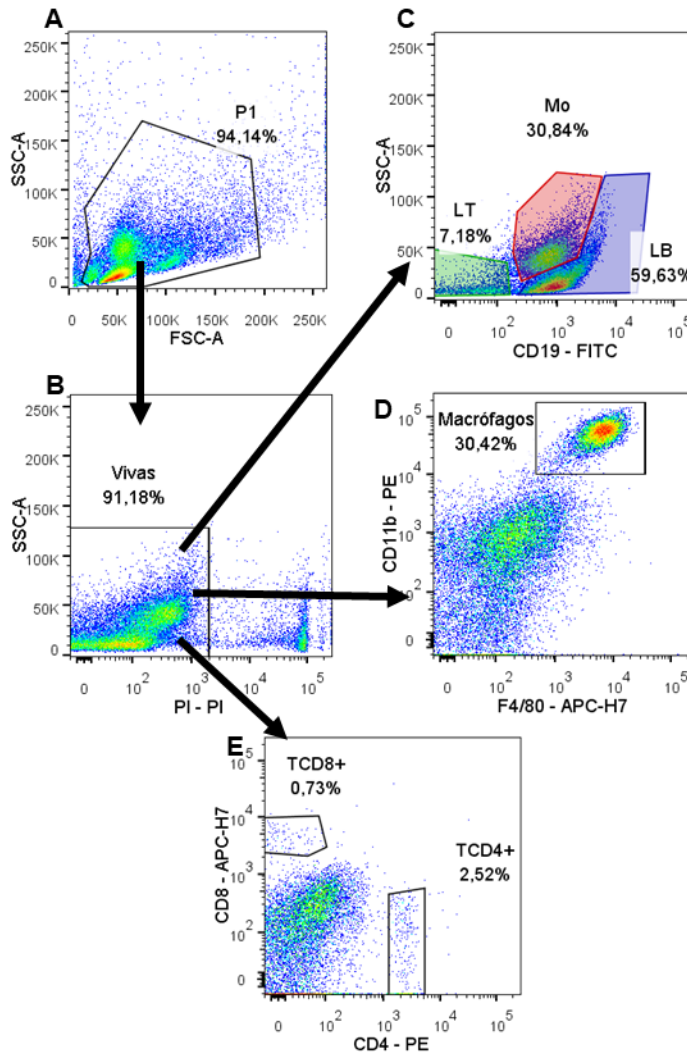
### 4.1 Comparación de poblaciones inmunes en el peritoneo de ratones lúpicos y controles

En la cavidad peritoneal existe una gran variedad de células que forman parte del sistema inmune. Todas ellas cumplen funciones relacionadas con la mantención de la homeostasis de esta cavidad y los órganos que se encuentran en conexión con ella (Abbas et al., 2012; Bain & Jenkins, 2018).

Alteraciones en la frecuencia de las poblaciones de células inmunes podrían correlacionarse con el desarrollo de la enfermedad, por lo cual, estudiamos la presencia de distintas poblaciones en la cavidad peritoneal de ratones enfermos de Lupus y controles. Para ello, realizamos la identificación mediante citometría de flujo de macrófagos, linfocitos B y linfocitos T utilizando marcadores de superficie específicos previamente descritos para cada población (Ghosn et al., 2010).

En la figura 1, se muestra la estrategia utilizada para la identificación de las poblaciones presentes en la cavidad peritoneal. En 1A, se muestra la distribución de las células considerando su granulosis (SSC) y su tamaño (FSC), lo que nos permite seleccionar las poblaciones celulares para su posterior análisis. Luego de descartar dobletes, utilizamos yoduro de propidio (PI) para identificar las células muertas, dejándolas fuera del análisis como se muestra en 1B. Del total de células vivas, gracias a las características de granulosis y de la expresión de la molécula CD19 (figura 1C), es posible separar aproximadamente las tres poblaciones inmunes analizadas en este seminario: Macrófagos ( $M\phi$ , en rojo), linfocitos B (LB, en azul) y linfocitos T (LT, en verde). Confirmamos esta aproximación al utilizar marcadores específicos para cada una de las poblaciones de interés.





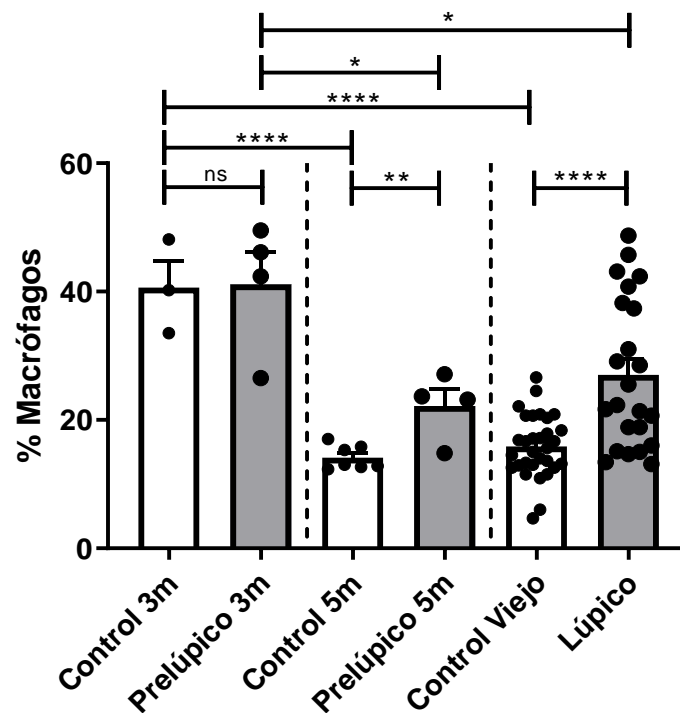
**Figura 1: Estrategia de análisis de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal.** Estrategia para la identificación de distintas poblaciones celulares basada en el uso de marcadores característicos. Se muestran resultados representativos de citometría de flujo correspondiente a un ratón lúpico, analizados con FlowJo X.

Del total de células vivas, determinamos la frecuencia de macrófagos ( $CD11b^{alto}/F4/80^{+}$ ) y la frecuencia de linfocitos T CD4 y CD8 presentes en el peritoneo (1D y 1E, respectivamente). Además, identificamos la frecuencia de linfocitos B que expresan CD5 dentro de la población  $CD19^{+}$ , que corresponden a Linfocitos B1a peritoneales.

### 4.1.1 Macrófagos

Los macrófagos constituyen la segunda mayor población celular en la cavidad peritoneal (Ghosn et al., 2010; Ito et al., 2004). En este trabajo se identifican mediante la expresión de CD11b<sup>alto</sup>, CD19<sup>-</sup> y F4/80<sup>+</sup>, siguiendo la estrategia de análisis descrita en 4.1.

En la figura 2 observamos que a partir de los 5 meses de edad, la frecuencia de macrófagos peritoneales en los ratones prelúpicos NZBW F1 ( $22,2 \pm 2,6\%$ ) es significativamente mayor que la frecuencia encontrada en los ratones controles de 5 meses ( $14,1 \pm 0,7\%$ ). Al desarrollar la enfermedad, esta diferencia se acentúa siendo la frecuencia de macrófagos peritoneales en los ratones enfermos ( $27 \pm 2,4\%$ ) el doble de la encontrada en ratones controles de la misma edad ( $15 \pm 1\%$ ).



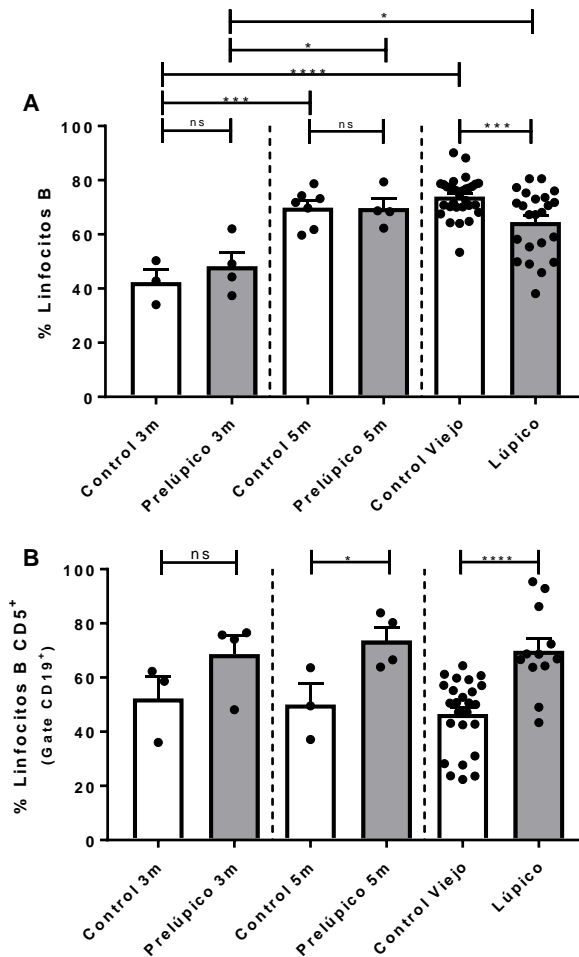
**Figura 2: El peritoneo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de macrófagos en comparación a ratones controles.** Porcentaje de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>) obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones controles, prelúpicos y enfermos. Cada punto representa un ratón. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la muestra. El análisis estadístico se realizó t de student o una comparación Mann-Whitney, según corresponda. Valores de P: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

Al analizar la frecuencia de macrófagos a lo largo de las 3 etapas etarias estudiadas, observamos (Figura 2) una disminución en la frecuencia de macrófagos con la edad tanto en ratones controles como susceptibles a desarrollar la enfermedad, siendo mayor en los ratones controles. Esta disminución se observa principalmente al comparar los ratones de 3 meses con los ratones de 5 meses en donde la disminución de la frecuencia de macrófagos es superior al 20%. Estas diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos se complementan con la dinámica observada en las otras poblaciones presentes en el peritoneo.

#### **4.1.2 Linfocitos B**

Las células inmunes más numerosas en la cavidad peritoneal son los linfocitos B. La presencia de linfocitos autorreactivos productores de autoanticuerpos se relaciona directamente con la enfermedad (Kaul y col., 2016; Sang y col., 2014; Sauma y col., 2017; Wither y col., 2000). Estos autoanticuerpos forman complejos inmunes responsables del daño tisular en algunos órganos, como en riñón en el caso de la nefritis lúpica (Davidson, 2016). Para analizar la frecuencia de linfocitos B en la cavidad peritoneal utilizamos la estrategia mostrada en la figura 1, en donde estas células son CD19<sup>+</sup>, CD11b<sup>int</sup> y F4/80<sup>-</sup>.

En la figura 3A observamos que los ratones lúpicos presentan una frecuencia de Linfocitos B ( $64,6 \pm 2,5\%$ ) significativamente menor que los ratones controles de la misma edad ( $73,9 \pm 1,3\%$ ). Esta diferencia significativa solo se observa al momento de desarrollar la enfermedad, ya que tanto a los 3 como a los 5 meses no existen diferencias significativas en la frecuencia de linfocitos CD19 totales.



**Figura 3: El peritoneo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de linfocitos B1a pero un menor porcentaje de linfocitos B totales en comparación a ratones controles.** (A) Porcentaje de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. (B) Porcentaje de linfocitos B CD5<sup>+</sup> correspondientes a LB 1a, analizados dentro del total CD19<sup>+</sup>. Cada punto representa un ratón. Las barras representan el promedio ± el error estándar de la muestra. Para el análisis estadístico se realizó t de student o una comparación Mann-Whitney, según corresponda. Valores de P: ns, p>0,05; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001; \*\*\*\*, P<0,0001.

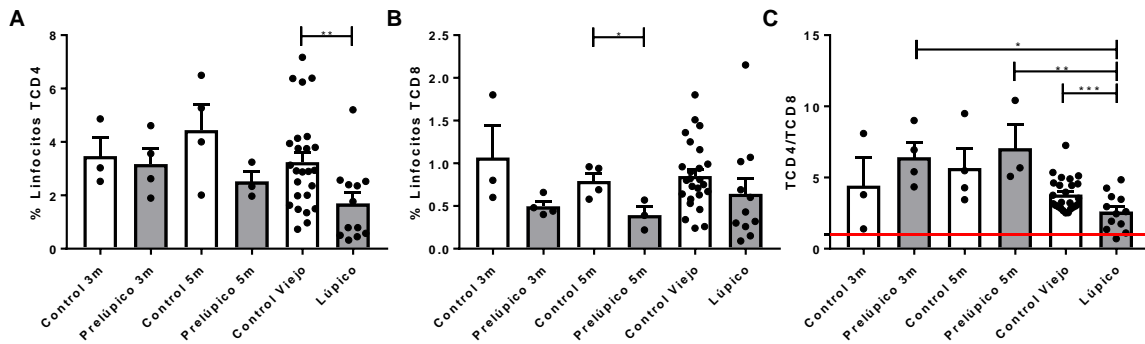
Un subtipo interesante de analizar en los linfocitos B peritoneales son los linfocitos B1. Estos son los responsables de la producción de anticuerpos naturales, sin la participación de un antígeno y se ha considerado que estarían relacionadas con las enfermedades autoinmunes (Duan & Morel, 2006; Ito et al., 2004; Xu, Butfiloski, Sobel, & Morel, 2004). Utilizando como marcador de superficie CD5, distinguimos la población de

linfocitos B1a en la cavidad peritoneal. En la figura 3B observamos que la mayor parte de los linfocitos B presentes en la cavidad peritoneal de ratones enfermos corresponden al subtipo B1a, siendo esta frecuencia significativamente mayor a la encontrada en ratones controles de la misma edad ( $69,9 \pm 4,5\%$  vs  $46,5 \pm 2,6\%$ ). Esta diferencia significativa también se encuentra en ratones de 5 meses, en donde este subtipo es el  $73,7 \pm 5\%$  del total de linfocitos B lúpicos y en controles solo alcanza el  $49,4 \pm 5,5\%$ .

#### **4.1.3 Linfocitos T**

La otra población linfoide que analizamos corresponde a los linfocitos T. En el estudio presentado por Composto y colaboradores del 2011, se muestra que la frecuencia de linfocitos T peritoneales es distinta a la que se encuentra en órganos linfoides tales como linfonodos o bazo (Composto y col., 2011).

Utilizando la estrategia de análisis planteada anteriormente (figura 1), es posible identificar la población de linfocitos T presentes en la cavidad peritoneal mediante la expresión de CD3 y del marcador característico de cada subtipo (CD4 o CD8). En la figura 4B vemos que el porcentaje de linfocitos TCD4 en los ratones lúpicos ( $1,7 \pm 0,4\%$ ) es significativamente menor que en los ratones controles de la misma edad ( $3,2 \pm 0,4\%$ ). En relación con los linfocitos TCD8, se observa que solo existen diferencias significativas a los 5 meses, en donde los ratones prelúpicos presentan un menor porcentaje en comparación a los controles ( $0,35 \pm 0,09\%$  vs  $0,79 \pm 0,09\%$ ). En ratones enfermos el porcentaje de TCD8 es menor que en controles de la misma edad, pero esta diferencia no es significativa debido a la dispersión de los datos.



**Figura 4: Análisis de linfocitos T de la cavidad peritoneal.** Determinación del subtipo CD4/CD8 de la cavidad peritoneal de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Frecuencia de linfocitos TCD4 (A) o TCD8 (B) en la cavidad peritoneal de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. (C) Razón entre la frecuencia de los subtipos analizados. La línea roja muestra el valor al cual existe la misma cantidad de linfocitos de cada subtipo. Cada punto representa un ratón. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la muestra. Para el análisis estadístico se realizó t de student o una comparación Mann-Whitney, según corresponda. Valores de P: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Siguiendo la comparativa propuesta por Composto y col. el 2011, calculamos la razón existente entre ambos subtipos en el peritoneo de los ratones analizados. Como se observa en la figura 4D, la tasa TCD4/TCD8 es significativamente menor en los ratones enfermos (2,5) en comparación con los ratones controles (3,8). Por otro lado, observamos que no existen diferencias entre controles y prelúpicos, pero una vez que se desarrolla la enfermedad, la tasa disminuye significativamente en los ratones lúpicos.

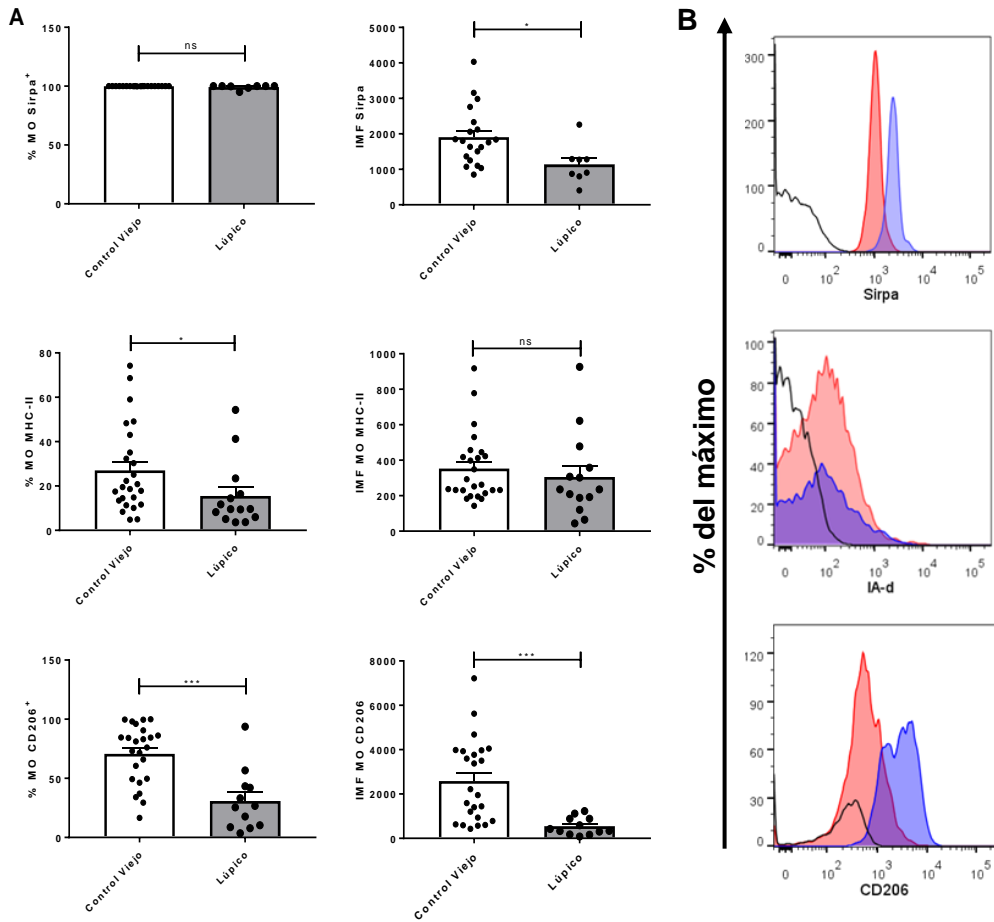
#### 4.2 Fenotipo de los macrófagos peritoneales de ratones enfermos de lupus y ratones sanos

Con el objetivo de caracterizar y detectar moléculas que podrían estar relacionadas con diferencias funcionales entre los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones controles y lúpicos, analizamos mediante citometría de flujo diferentes receptores. Específicamente analizamos la expresión de SIRP $\alpha$ , MHC-II y CD206, los cuales están relacionados con la capacidad de fagocitosis de células apoptóticas, la presentación de antígenos y el perfil de activación, respectivamente.

Para el caso de SIRP $\alpha$ , las células no apoptóticas presentan en su superficie la molécula CD47 que actúa como ligando del receptor SIRP $\alpha$  inhibiendo la fagocitosis de las células que lo expresan. En la figura 5A, observamos que no existen diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos que expresan este receptor, dado que la totalidad de ellos lo expresa, tanto en ratones controles como en lúpicos. Sin embargo, al observar la intensidad media de fluorescencia de SIRP $\alpha$  (figura 5B), observamos que los macrófagos provenientes de ratones enfermos de Lupus tienen significativamente menor expresión del receptor en su superficie en comparación con los macrófagos controles.

Con el objetivo de comparar eventuales deficiencias en la capacidad de presentación antigénica entre los macrófagos provenientes de ratones controles y ratones enfermos, analizamos la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de tipo 2 o MHC-II. Como se muestra en la figura 5A, en la cavidad peritoneal de ratones enfermos de Lupus existe un porcentaje significativamente menor de macrófagos MHC-II<sup>+</sup> en comparación con los ratones controles ( $15,5 \pm 3,9\%$  vs  $27 \pm 3,9\%$ ). Por otro lado, no existen diferencias significativas en la intensidad media de fluorescencia de este marcador.

El receptor de manosa *mrc1* o CD206 se ha utilizado como un marcador de macrófagos alternativamente activados (M2) los cuales han sido asociados a una función reparatoria antiinflamatoria de los tejidos en los cuales se encuentran (Cassado et al., 2015; Mosser & Edwards, 2008). Como se observa en la figura 5A, su frecuencia es significativamente menor en los ratones enfermos ( $30,8 \pm 7,4\%$ ) cuando se comparan con ratones controles de la misma edad ( $70,7 \pm 5,1\%$ ), resultado que se condice con lo encontrado en la intensidad media de fluorescencia (figura 5B). Este resultado sugiere que los macrófagos residentes en la cavidad peritoneal de ratones enfermos se alejan del fenotipo asociado a al perfil de activación M2.

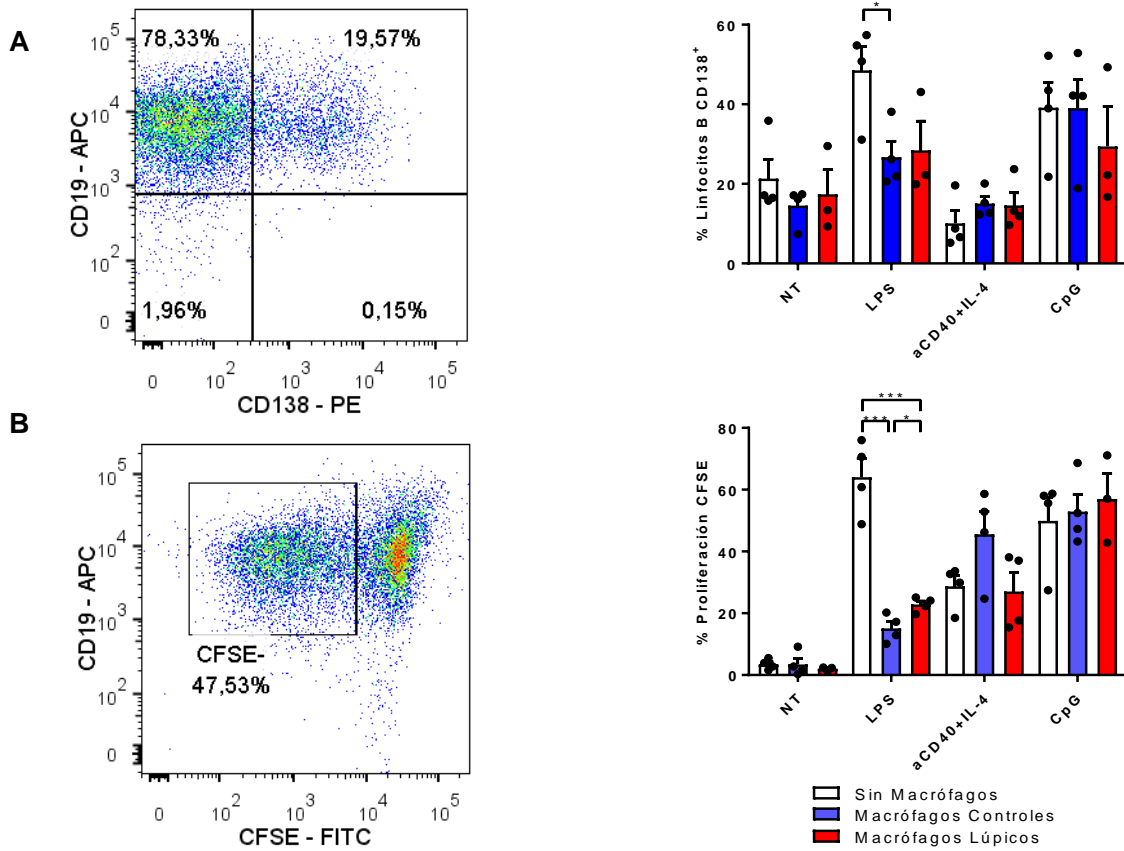


**Figura 5: Los macrófagos peritoneales de ratones lúpicos tienen un fenotipo que se aleja del perfil M2.** Análisis de citometría de flujo de la expresión de SIRP $\alpha$ , MHC-II y CD206. (A) Porcentaje de macrófagos SIRP $\alpha$ <sup>+</sup>, MHC-II<sup>+</sup> y CD206<sup>+</sup> (izquierda) e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para cada marcador (derecha). (B) Histogramas representativos de la expresión de SIRP $\alpha$ , MHC-II y CD206 en macrófagos provenientes de ratones controles (Azul) y ratones lúpicos (Rojo). El FMO corresponde al histograma negro. Cada punto representa un ratón. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la muestra. Para el análisis estadístico se realizó t de student o una comparación Mann-Whitney, según corresponda. Valores de P: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

### 4.3 Cocultivo de linfocitos B controles y macrófagos peritoneales lúpicos y controles.

Al ser los macrófagos y los linfocitos B las poblaciones más numerosas dentro de la cavidad peritoneal, es interesante estudiar la interacción entre estas células. Para analizar el efecto que podrían tener los macrófagos de la cavidad peritoneal en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B peritoneales, realizamos cocultivos en presencia de distintos estímulos.





**Figura 6: Los Macrófagos de la cavidad peritoneal suprimen la proliferación de linfocitos B en presencia de LPS.** Linfocitos B provenientes de ratones controles se cultivaron con o sin macrófagos en presencia de distintos estímulos (LPS,  $\alpha$ -CD40 + IL-4 o CpG). Luego de 4 días, se evaluó la diferenciación de los LB hacia células preplasmáticas CD138<sup>+</sup> (A) y su proliferación en base a la dilución de CFSE (B). Se muestra citometría de flujo representativa de cada característica analizada. Cada punto representa un cocultivo de macrófagos y linfocitos B independiente. Las barras blancas corresponden a la condición de linfocitos B sin macrófagos, las barras azules a la condición de LB con macrófagos controles y las barras rojas con macrófagos lúpicos. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la muestra. Para el análisis estadístico se realizó t de student o una comparación Mann-Whitney, según corresponda. Valores de P: \*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0,001.

Evaluando la expresión del marcador CD138 (figura 6A) es posible observar la diferenciación de los linfocitos B hacia células preplasmáticas que son CD138 y CD19 positivas. Como se muestra en 6A, solo al estimular las células con LPS se observa una inhibición en la diferenciación hacia células preplasmáticas, siendo los macrófagos provenientes de ratones controles los únicos capaces de inhibir de manera significativa la diferenciación mientras que en presencia de macrófagos lúpicos solo se observa la tendencia de esta inhibición. En presencia de otros estímulos, no se observaron diferencias

significativas, siendo el estímulo  $\alpha$ -CD40 + IL-4 el menos eficiente en inducir la diferenciación de los linfocitos B.

Analizando la dilución de CFSE es posible estudiar el efecto de los macrófagos provenientes de ratones controles y lúpico en la proliferación de los linfocitos B previamente marcados (Figura 6B). La presencia de macrófagos suprime significativamente la proliferación de los Linfocitos B solo en presencia de LPS, observándose que los macrófagos controles son más eficientes que los macrófagos lúpicos. En el caso de  $\alpha$ -CD40 + IL-4 se observa que los macrófagos obtenidos de ratones controles favorecerían la proliferación y los macrófagos lúpicos no la moderarían, sin embargo, el resultado representa solo una tendencia y no es significativo.

## 5. DISCUSIÓN

El Lupus es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de autoanticuerpos en contra de componentes nucleares, que una vez que reconocen y unen a su autoantígeno, forman inmunocomplejos que se depositan en diversos órganos produciendo daño tisular (Kaul y col., 2016). Esta enfermedad ha sido históricamente ligada a un trastorno de la inmunidad adquirida, analizando el rol de los linfocitos T y linfocitos B autorreactivos en su desarrollo. Nueva evidencia en la literatura ha puesto de manifiesto la necesidad de estudiar el rol de los macrófagos en el Lupus debido a su función como encargados de la limpieza de las células apoptóticas y el debris celular. Estos estudios indican que los macrófagos de pacientes enfermos de Lupus serían menos efectivos en la limpieza del debris celular de las células apoptóticas, prolongando la exposición de células del sistema inmune adaptativo frente a potenciales autoantígenos (Bijl y col., 2006; Tas y col., 2006). Sin embargo, estos estudios han sido realizados en macrófagos derivados de monocitos presentes en la sangre periférica a través de la estimulación con diversas citoquinas de manera *in vitro*, no existiendo antecedentes de estas diferencias con macrófagos residentes de tejido.

La cavidad peritoneal constituye un buen sitio de análisis de la interacción de los macrófagos con las demás poblaciones celulares involucradas con el desarrollo del Lupus, como los linfocitos B y linfocitos T. Con el objetivo de caracterizar la frecuencia de estas poblaciones antes y durante el desarrollo de la enfermedad, utilizamos la estrategia de análisis de citometría de flujo mostrada en la figura 1, en donde fue posible identificar claramente las poblaciones buscadas. Al agregar otros marcadores, sería posible expandir el estudio propuesto a otros subtipos de linfocitos B o linfocitos T, así como también analizar las dinámicas de otras poblaciones inmunes como neutrófilos, granulocitos, NK, ILCs, etc.

Los análisis de citometría de flujo evidenciaron un mayor porcentaje de macrófagos en el peritoneo de los ratones lúpicos en comparación a los ratones controles (figura 2),

incluso antes de que los ratones desarrollen la enfermedad (ratones de 5 meses). Esta mayor frecuencia puede deberse a que el peritoneo de los ratones lúpicos se encontraría inflamado, sometido a algo similar a lo descrito en ratones tratados con agentes que desencadenan procesos inflamatorios como tioglicolato. El tratamiento en estos ratones induce el reclutamiento desde la circulación sanguínea de monocitos que se diferencian a macrófagos, aumentando la frecuencia de estas células en comparación con los ratones no tratados (Bain & Jenkins, 2018; Ghosn et al., 2010).

Se ha descrito que los linfocitos B corresponden a la población más numerosa de la cavidad peritoneal, con una frecuencia que puede sobrepasar el 60% de las células inmunes presentes (Cassado y col., 2015; Goldman y col., 2017). Mediante citometría de flujo evidenciamos que en el peritoneo de los ratones enfermos de Lupus existe una frecuencia significativamente menor de linfocitos B respecto a los controles (figura 3A). Al analizar el marcador CD5 asociado al subtipo B1a (figura 3B), observamos que existe una diferencia significativa en la composición de los linfocitos B presentes en la cavidad peritoneal, teniendo una mayor frecuencia de linfocitos B1a en los ratones lúpicos que en los ratones controles.

La subpoblación de linfocitos en sangre periférica B1a ha sido relacionada con una serie de enfermedades autoinmunes como la anemia hemolítica autoinmune (AHA) (Hayakawa y col., 1983), el síndrome de Sjögren's (Dauphinée y col., 1988) y la artritis autoinmune (Deng y col., 2016) debido a la directa correlación entre el aumento en la frecuencia de estos linfocitos y la aparición de la enfermedad. Más precisamente, el grupo de Murakami en 1995 reportó que la eliminación de linfocitos B1a de la cavidad peritoneal en ratones NZB y NZBW F1 disminuye los anticuerpos anti-ADN en el suero y reduce los signos patológicos del Lupus en el riñón (Murakami y col., 1995).

Los linfocitos B1 peritoneales presentan mayor expresión del receptor CXCR5, que se une a la quimioquina CXCL13 que se produce principalmente por macrófagos de la

cavidad peritoneal (Ansel y col., 2002). Esta sobre expresión de su receptor, tendría como consecuencia la acumulación preferencial de linfocitos B1 frente a los B2 u otro tipo celular en la cavidad peritoneal de ratones lúpicos (Ishikawa y col., 2002). Una alta expresión en el plasma sanguíneo de CXCL13 se ha correlacionado de manera directa con el índice de actividad del Lupus, proponiendo su potencial uso como marcador temprano de la reactivación de la enfermedad (Wong y col., 2010). Otro factor a considerar al analizar los Linfocitos B en los ratones enfermos es que, el locus de susceptibilidad al Lupus Sle2, se ha asociado con una mayor proliferación, sobrevivida e incremento en la vida adulta de los linfocitos B y por lo tanto, en mayor porcentaje de linfocitos B1a (Xu y col., 2004).

Al analizar a los linfocitos T, observamos menos TCD4 en los ratones enfermos respecto de los controles (Figura 4), siendo no significativa la diferencia en el subtipo TCD8. El grupo de Composto en el 2011 realizó un estudio comparativo en las cepas C57BL/6J, Balb/c, DBA/2J y la cepa deficiente de linfocitos B Balb.xid. Este estudio mostró que existen diferencias significativas entre cada una de las cepas, variando el porcentaje y la tasa CD4/CD8 dentro de los linfonodos, bazo y peritoneo. Adicionalmente, este estudio determinó que en el peritoneo existe una mayor proporción de linfocitos T de memoria y efectores al comparar con el bazo o linfonodos (Composto y col., 2011). En nuestro caso, sería interesante analizar las subpoblaciones de linfocitos TCD4 y TCD8, así como también los marcadores de memoria como CD62L y CD44, permitiendo un análisis más profundo de las dinámicas de esas subpoblaciones en el desarrollo de la enfermedad.

Con el objetivo de comparar el fenotipo de los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones controles y lúpicos, analizamos mediante citometría de flujo SIRP $\alpha$ , MHC-II y CD206 mostrando sus resultados en la figura 5. Al comparar la expresión de SIRP $\alpha$ , que actúa como receptor inhibitorio del ligando CD47 presente en las células no apoptóticas (Ley y col., 2016; Ravichandran, 2010) observamos que los macrófagos lúpicos

presentan significativamente menos moléculas en su superficie que los macrófagos controles, indicado por las diferencias observadas en la intensidad media de fluorescencia del marcador (IMF). Esto sugiere que existen diferencias en la capacidad de reconocimiento de las células apoptóticas por parte de los macrófagos de ratones enfermos. Una manera de abordar esto sería realizar ensayos funcionales directos de la capacidad fagocítica de las células apoptóticas por los macrófagos peritoneales. Los resultados esperados estarían en correlación con una capacidad fagocítica deficiente en los macrófagos lúpicos, efecto que ha sido reportado en macrófagos derivados de sangre periférica en pacientes de Lupus activo (Bijl y col., 2006; Tas y col., 2006).

Al analizar la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo dos o MHC-II, en la figura 5 se observa que en la cavidad peritoneal de ratones lúpicos existe una frecuencia significativamente menor de macrófagos MHC-II<sup>+</sup> que en la cavidad peritoneal control. Sin embargo, no existen diferencias en la intensidad media de fluorescencia de este marcador. Este resultado muestra que no existen diferencias en la cantidad de MHC-II en la superficie de los macrófagos, sugiriendo que los macrófagos peritoneales de ambas cavidades comparten la misma capacidad de presentación antigénica.

La expresión del receptor de manosa mrc1 o CD206 se ha propuesto como un marcador presente en los macrófagos alternativamente activados o M2 los cuales tendrían una función más inmunosupresora y reparadora en los tejidos en los cuales se encuentran en comparación con los clásicamente activados o M1, de características más inflamatorias (A. A. Cassado y col., 2015; Mosser & Edwards, 2008). Como se observa en la figura 5, su frecuencia e intensidad media de fluorescencia es significativamente menor en los ratones enfermos que en los controles sugiriendo que no se tratan de macrófagos M2. Sin embargo, los marcadores característicos de macrófagos M1, como por ejemplo iNOs, STAT1 o IL-6 (Mantovani y col., 2013) no se encuentran diferencialmente expresados en los macrófagos lúpicos (datos no mostrados), por lo cual, solo es posible determinar que los macrófagos de

la cavidad peritoneal de ratones enfermos se alejarían del fenotipo M2, pero no es posible asegurar que se traten de macrófagos M1.

Con el objetivo de evaluar la influencia de los macrófagos sobre los linfocitos B, analizamos cocultivos de linfocitos B más macrófagos peritoneales en presencia de distintos estímulos (LPS, CpG o anti-CD40 + IL-4). Estos estímulos actúan de distinta manera sobre los linfocitos B o los macrófagos, tal como se detalla a continuación: El **LPS** es el componente principal de las bacterias gram negativas y es capaz de activar tanto a macrófagos como a linfocitos B a través de la unión a TLR4. El efecto sobre los linfocitos B es inducir la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD86 induciendo su proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas (Minguet y col., 2008). **CpG** es un oligonucleótido comercial que sirve como ligando del TLR9, permitiendo simular al DNA bacteriano o viral. Disfunciones en el TLR7 y como en el TLR9 han sido asociadas al desarrollo del Lupus y otras enfermedades autoinmunes (Santiago-Raber y col., 2009). La combinación de **anti-CD40 + IL-4** permite la activación de los linfocitos B. Anti-CD40 actúa como CD40L que estimula la expansión clonal y la diferenciación de linfocitos B, mientras que IL-4 mantiene la supervivencia y la proliferación en conjunto con promover el cambio de isotipo y la secreción de anticuerpos (Hasbold y col., 1998; Rush & Hodgkin, 2001).

Al estudiar la diferenciación de los linfocitos B (Figura 6A), se observa que el cultivo en presencia de LPS y CpG induce una mayor diferenciación que en el cultivo no tratado, independiente de la presencia de macrófagos peritoneales controles o lúpicos. Adicionalmente, en la condición en presencia de LPS se observa que los macrófagos son capaces de inhibir la diferenciación de los linfocitos B a células preplasmáticas, siendo significativo en el caso de los macrófagos controles.

Al analizar la proliferación (Figura 6B) observamos que en presencia de LPS los macrófagos suprimen de manera significativa la proliferación de los linfocitos B, siendo significativamente más eficientes los macrófagos de la cavidad peritoneal control. Este

resultado se condice con lo mostrado en el artículo de Goldman y col. del año 2017, en donde las células totales de la cavidad peritoneal suprimen la proliferación de linfocitos B en presencia de LPS mientras que las células del bazo no lo hacen. Al utilizar células totales de la cavidad peritoneal, los autores solo pueden atribuir indirectamente el efecto observado a los macrófagos peritoneales, debido a que son la segunda población más numerosa en la cavidad peritoneal. Nuestros resultados, al utilizar macrófagos y linfocitos B con una pureza de al menos 95%, permiten complementar estas observaciones y definir a los macrófagos como los responsables del efecto encontrado. Tanto en presencia de CpG como de  $\alpha$ -CD40 + IL-4 no observamos diferencias significativas ni en la diferenciación a células plasmáticas ni en la proliferación de los linfocitos B en presencia de macrófagos respecto al cultivo sin macrófagos. Esto puede deberse a que los macrófagos de la cavidad peritoneal carecerían del receptor para CpG, TLR9, debido al microambiente presente en el peritoneo, estando programados para la “limpieza silenciosa” de las células apoptóticas y así no iniciar una reacción inflamatoria por parte del sistema inmune (Roberts y col., 2017).

En el artículo de Thies y col. del año 2013 se muestra que los macrófagos peritoneales promueven la supervivencia y la proliferación de los linfocitos B1 hasta por lo menos las 72 hrs de cultivo. En este mismo trabajo, los autores realizan experimentos en transwell, en donde observan que el efecto mediado por los macrófagos no es contacto dependiente y se trataría de un factor soluble que posteriormente identifican como la IL-6. Para obtener resultados más acabados de la interacción entre estas células, sería interesante repetir los experimentos con algunas variaciones, por ejemplo, alterar las proporciones celulares (Linfocitos B/Macrófago), utilizar otros activadores y distintos tiempos de cocultivo.

El conjunto de los resultados presentados en este seminario de título permiten concluir que existen diferencias significativas en la cavidad peritoneal de ratones enfermos de Lupus respecto a ratones controles. Encontramos diferencias significativas en la



frecuencia de las poblaciones peritoneales, en donde los ratones enfermos presentan un mayor porcentaje de macrófagos y un menor porcentaje de linfocitos B y linfocitos TCD4. Además, los macrófagos del peritoneo de ratones enfermos de Lupus presentan un perfil de activación que se alejaría del tipo M2, medido por la expresión de CD206. La expansión de macrófagos que se alejan del fenotipo antiinflamatorio se condice con lo esperado dentro de una enfermedad inflamatoria como el Lupus, en donde los fenómenos observados son más bien sistémicos y no solo locales.

Hay que destacar que los datos mostrados en este seminario corresponden a observaciones realizadas sobre las células presentes en la cavidad peritoneal de ratones enfermos de lupus, significando una diferencia frente a los estudios realizados anteriormente, en donde se estudiaba la función y diferenciación de macrófagos inducidos *in vitro* a partir de medula ósea o en cultivos celulares donde la pureza de los macrófagos no puede ser correctamente determinada (Composto y col., 2011; Thies y col., 2013)

Se debe tener en consideración que el desencadenamiento del Lupus tiene un origen multifactorial, en donde una serie de desregulaciones deben producirse de manera que se rompa la tolerancia a lo propio y se desencadene una respuesta autoinmune afectando distintos tejidos y órganos. Es por ello, que se deben realizar mayores esfuerzos para avanzar en la comprensión del rol que tienen los macrófagos en el desencadenamiento de la enfermedad, en especial los residentes en el peritoneo. En este contexto este seminario abre nuevas preguntas que, de ser resueltas, constituirán un aporte al entendimiento del origen y progresión de la enfermedad.

## 6. RESUMEN RESULTADOS

- Ratones enfermos de Lupus presentan una mayor frecuencia de macrófagos en la cavidad peritoneal que ratones controles de la misma edad.
- En los ratones enfermos existe una disminución significativa del porcentaje de linfocitos B peritoneales.
- A partir de los 5 meses de edad, existe una mayor frecuencia de linfocitos B CD5<sup>+</sup> en ratones preláupicos que se exagera al desarrollar la enfermedad.
- Los linfocitos TCD4 peritoneales en ratones lúpicos son menos frecuentes que en ratones controles de la misma edad a la vez que existe una menor tasa de linfocitos T CD4/CD8 al desarrollar la enfermedad.
- Los macrófagos peritoneales de ratones lúpicos se alejan del perfil M2 al poseer menor expresión de CD206 que los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones controles.
- Los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones controles y lúpicos no se diferencian en la expresión de MHC-II. En el caso de SIRP $\alpha$  solo se diferencian en la intensidad media de fluorescencia.
- Los macrófagos de la cavidad peritoneal son capaces de suprimir la proliferación con el estímulo de LPS de linfocitos B peritoneales de ratones controles. Los macrófagos controles suprimen más que los macrófagos lúpicos esta proliferación.
- Los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones controles son capaces de inhibir la diferenciación hacia células preplasmáticas CD138<sup>+</sup> de linfocitos B peritoneales en presencia de LPS, mientras que los macrófagos peritoneales de ratones lúpicos solo muestran una tendencia.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este seminario de título nos llevan a concluir que existen alteraciones homeostáticas en la cavidad peritoneal de los ratones enfermos de lupus y que estas diferencias se evidencian en variaciones significativas en la frecuencia y fenotipo de los macrófagos peritoneales, existiendo una acumulación de ellos en los ratones enfermos. Adicionalmente observamos que los linfocitos B peritoneales de los ratones lúpicos son mayoritariamente B1, sin embargo, el número de linfocitos B totales es menor que en los ratones controles. Mediante la evaluación de CD206, se sugiere que la población de macrófagos peritoneales observada en los ratones enfermos de Lupus se aleja del perfil de polarización antiinflamatorio M2. Los experimentos realizados también permiten concluir que los macrófagos peritoneales son capaces de suprimir la proliferación e inhibir la polarización de linfocitos B peritoneales controles, siendo menos eficiente en estos procesos los macrófagos obtenidos de ratones enfermos.

El LES es una de enfermedad modelo de autoinmunidad que, por su complejidad, cualquier entendimiento en ella se puede extrapolar a todo el espectro de enfermedades autoinmunes expandiendo los beneficios de continuar realizando esfuerzos en investigar su desarrollo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A., & Pillai, S. (2012). *Inmunología Celular y molecular* (Séptima Ed). Elsevier.
- Amur, S., Parekh, A., & Mummaneni, P. (2012). Sex differences and genomics in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 38(2–3), J254–J265. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.12.001>
- Ansel, K. M., Harris, R. B. S., & Cyster, J. G. (2002). CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*, 16(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00257-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00257-6)
- Baal, J. O. A. M. Van, Vijver, K. K. Van De, Nieuwland, R., Noorden, C. J. F. Van, Driel, W. J. Van, Sturk, A., ... Lok, C. A. R. (2017). Tissue and Cell The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue and Cell*, 49(1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.11.004>
- Bain, C. C., & Jenkins, S. J. (2018). The biology of serous cavity macrophages. *Cellular Immunology*, 330, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.003>
- Banchereau, R., Hong, S., Cantarel, B., Baldwin, N., Baisch, J., Edens, M., ... Pascual, V. (2016). Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell*, 165(3), 551–565. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.008>
- Baumgarth, N. (2010). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*, 11(1), 34–46. <https://doi.org/10.1038/nri2901>
- Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P. C., & Kallenberg, C. G. M. (2006). Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: Correlates with decreased serum levels of complement. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(1), 57–63. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.035733>
- Cassado, A. A., D'Império Lima, M. R., & Bortoluci, K. R. (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225>
- Celhar, T., & Fairhurst, A. M. (2017). Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories. *Rheumatology (Oxford, England)*, 56(1), i88–i99. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew400>
- Composto, G., Gonzalez, D., Bucknum, A., Silberman, D., Taylor, J., Kozlowski, M., ... Riggs, J. (2011). Peritoneal T lymphocyte regulation by macrophages. *Immunobiology*, 216(1–2), 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.04.002>
- Dauphinée, M., Tovar, Z., & Talal, N. (1988). B cells expressing cd5 are increased in sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*, 31(5), 642–647. <https://doi.org/10.1002/art.1780310509>
- Davidson, A. (2016). What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nature Reviews*

*Rheumatology*, 12(3), 143–153. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.159>

Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, 14(10), 986–995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>

Davies, L. C., Rice, C. M., Palmieri, E. M., Taylor, P. R., Kuhns, D. B., & McVicar, D. W. (2017). Peritoneal tissue-resident macrophages are metabolically poised to engage microbes using tissue-niche fuels. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02092-0>

Deng, J., Wang, X., Chen, Q., Sun, X., Xiao, F., Ko, K.-H., ... Lu, L. (2016). B1a cells play a pathogenic role in the development of autoimmune arthritis. *Oncotarget*, 7(15). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8244>

Dixon, F. J., Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., McConahey, P. J., Theofilopoulos, A. N., & Wilson, C. B. (1978). Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. *Arthritis & Rheumatism*, 21(1 S), S64–S67. <https://doi.org/10.1002/art.1780210909>

Duan, B., & Morel, L. (2006). Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.10.007>

Gaipl, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., ... Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of Autoimmunity*, 28(2–3), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.005>

Gatto, M., Zen, M., Iaccarino, L., & Doria, A. (2018). New therapeutic strategies in systemic lupus erythematosus management. *Nature Reviews Rheumatology*. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0133-2>

Ghosn, E. E. B., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., ... Herzenberg, L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2568–2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841 LP – 845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

Goldman, N., Valiuskyte, K., Londregan, J., Swider, A., Somerville, J., & Riggs, J. E. (2017). Macrophage regulation of B cell proliferation. *Cellular Immunology*, 314, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.002>

Hasbold, J., Lyons, A. B., Kehry, M. R., & Hodgkin, P. D. (1998). Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *European Journal of Immunology*, 28(3), 1040–1051. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199803\)28:03<1040::AID-IMMU1040>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<1040::AID-IMMU1040>3.0.CO;2-9)

Hayakawa, K., Hardy, R., & Herzenberg, L. A. (1986). Peritoneal Ly-1 B cells : genetic

- control , autoantibody production , increased lambda light chain expression. *European Journal of Immunology*, 16, 450–456.
- Hayakawa, K., Hardy, R., Parks, D., & Herzenberg, L. A. (1983). The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *Journal of Experimental Medicine*, 157(January), 202–218.
- Hochreiter-hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the Dead : Apoptotic Cell Sensing ., *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008748. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008748>
- Ishikawa, S., Sato, T., Abe, M., Matsushima, K., Nagai, S., Zhang, Y., ... Lipp, M. (2002). Aberrant High Expression of B Lymphocyte Chemokine (Blc/Cxcl13) by C11b + Cd11c + Dendritic Cells in Murine Lupus and Preferential Chemotaxis of B1 Cells towards Blc. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(12), 1393–1402. <https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1393>
- Ito, T., Sato, T., Akadegawa, K., Yurino, H., Kitabatake, M., Hontsu, S., ... Alerts, E. (2004). Defective B1 Cell Homing to the Peritoneal Cavity and Preferential Recruitment of B1 Cells in the Target Organs in a Murine Model for Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of immunology*, (172), 3638–3634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3628>
- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., Van Vollenhoven, R., ... Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(June), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.39>
- Ley, K., Pramod, A. B., Croft, M., Ravichandran, K. S., & Ting, J. P. (2016). How Mouse Macrophages Sense what is Going On. *Frontiers in Immunology*, 7(204), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00204>
- Lipsky, P. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunology*, 2–4.
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *Journal of Pathology*, 229(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Minguet, S., Dopfer, E. P., Pollmer, C., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Reth, M., ... Schamel, W. W. (2008). Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *European Journal of Immunology*, 38(9), 2475–2487. <https://doi.org/10.1002/eji.200738094>
- MINSAL. (2013). Guía Clínica AUGE Lupus Eritematoso Sistémico. Santiago: MINSAL.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature Reviews*

*Rheumatology*, 6(5), 280–289. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.46>

- Murakami, M., Yoshioka, H., Shirai, T., Tsubata, T., & Honjo, T. (1995). Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. *International Immunology*, 7(5), 877–882. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.5.877>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Ochsenbein, A. F., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., & Nussenzweig, M. C. (1999). Control of Early Viral and Bacterial Distribution and Disease by Natural Antibodies. *Science*, 286(5447), 2156–2159. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2156>
- Patel, D. R., & Richardson, B. C. (2010). Epigenetic mechanisms in lupus. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(5), 478–482. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32833ae915>
- Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., & Morel, L. (2011). Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2011/271694>
- Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1807–1817. <https://doi.org/10.1084/jem.20101157>
- Reeves, W. H., Lee, P. Y., Weinstein, J. S., Satoh, M., & Lu, L. (2009). Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in Immunology*, 30(9), 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.06.003>
- Roberts, A. W., Lee, B. L., Deguine, J., John, S., Shlomchik, M. J., & Barton, G. M. (2017). Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity*, 47(5), 913–927.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.006>
- Rush, J. S., & Hodgkin, P. D. (2001). B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *European Journal of Immunology*, 31(4), 1150–1159. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200104\)31:4<1150::AID-IMMU1150>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200104)31:4<1150::AID-IMMU1150>3.0.CO;2-V)
- Sang, A., Zheng, Y. Y., & Morel, L. (2014). Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Molecular Immunology*, 62(2), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.013>
- Santiago-Raber, M. L., Baudino, L., & Izui, S. (2009). Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE. *Journal of Autoimmunity*, 33(3–4), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.10.001>
- Sauma, D., Crisóstomo, N., Fuentes, C., Gleisner, M. A., Hidalgo, Y., Fuenzalida, M. J., ... Bono, M. R. (2017). Adoptive transfer of autoimmune splenic dendritic cells to lupus-prone mice triggers a B lymphocyte humoral response. *Immunologic Research*, 65(4), 957–968. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8936-9>

- Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., ... Geissmann, F. (2012). A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science*, 336(6077), 86 LP – 90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- Shlomchik, M. J., Craft, J. E., & Mamula, M. J. (2001). From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 1(November).
- Suárez-Fueyo, A., Bradley, S. J., & Tsokos, G. C. (2016). T cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Current Opinion in Immunology*, (43), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.09.001>
- Tas, S. W., Quartier, P., Botto, M., & Fossati-Jimack, L. (2006). 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*, 65(2), 216–221. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.037143>
- Thies, F. G., Laurindo, M. F. L., Perez, E. C., Novaes e Brito, R. R., Mariano, M., & Popi, A. F. (2013). Cross Talk between Peritoneal Macrophages and B-1 Cells In Vitro. *PLoS ONE*, 8(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062805>
- Tsunematsu, T., Ishimaru, N., Kudo, Y., Arakaki, R., Yamada, A., Ushio, A., & Saito, M. (2017). Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. *World Journal of Immunology*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.5411/wji.v7.i1.1>
- Wang, J., & Kubes, P. (2016). A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell*, 165(3), 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.009>
- Wither, J. E., Paterson, A. D., & Vukusic, B. (2000). Genetic dissection of B cell traits in New Zealand black mice. The expanded population of B cells expressing up-regulated costimulatory molecules shows linkage to Nba2. *European Journal of Immunology*, 30(2), 356–365. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200002\)30:2<356::AID-IMMU356>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200002)30:2<356::AID-IMMU356>3.0.CO;2-H)
- Wong, C. K., Wong, P. T. Y., Tam, L. S., Li, E. K., Chen, D. P., & Lam, C. W. K. (2010). Elevated production of B Cell Chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *Journal of Clinical Immunology*, 30(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9325-5>
- Wong, S., Puaux, A., Chittezhath, M., Shalova, I., Kajiji, T. S., Wang, X., ... Biswas, S. K. (2010). Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *European Journal of Immunology*, 40, 2296–2307. <https://doi.org/10.1002/eji.200940288>
- Xu, Z., Butfiloski, E. J., Sobel, E. S., & Morel, L. (2004). Mechanisms of peritoneal B-1a cells accumulation induced by murine lupus susceptibility locus Sle2. *Journal of immunology*, 173(10), 6050–6058. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6050>