



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE POSTGRADO

“Caracterización inmunológica de los macrófagos peritoneales en un modelo murino de Lupus eritematoso sistémico (LES)”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Nicolás Alejandro Valdivieso Berríos

Junio, 2022

Director de Tesis Doctora María Rosa Bono

Santiago, Chile

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Nicolás Alejandro Valdivieso Berríos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:
Doctora María Rosa Bono.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Doctora Daniela Sauma Mahaluf.

Doctora María Inés Becker C.

BIOGRAFÍA



Nací en el 20 de septiembre de 1991, tuve una infancia tranquila junto a mis padres y hermanas. Durante el desarrollo de mis estudios escolares, terminé por interesarme en la Biología, en especial por cómo funcionan los organismos vivos y como se desenvuelve la vida.

Ingresé a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular y posteriormente durante el 2017 la Dra. Bono me aceptó en el Laboratorio de Inmunología y desde entonces he podido vincular mis ganas de contribuir al entendimiento del funcionamiento de lo vivo con el objetivo de ayudar dentro de la medicina. Terminé mis estudios de pregrado el 2020 cuando ya había iniciado el camino de continuar mi formación en el Magíster en Ciencias Biológicas y he continuado desde entonces con el deseo de contribuir con un poco de conocimiento y, por, sobre todo, de ayudar a que se vaya relevando lo misterioso y desconocido.

Vamos avanzando...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la profesora María Rosa Bono. Sin la apuesta que realizó al aceptarme en el laboratorio el 2017 nada de esto sería de la misma manera. A lo largo de estos años, con mi tesis de pregrado y este trabajo de magíster he podido aprender a conocer la interesante persona que es y la científica extraordinaria que me ha compartido su visión del mundo científico del que ya formo parte.

Agradezco las reuniones y comentarios que hemos podido hacer con los otros profesores del laboratorio, la profesora Daniela Sauma y el profesor Mario Roseblatt. A lo largo de estos años he tenido la fortuna de compartir con ustedes y aprender nuevas visiones de los misterios de la inmunología. Agradezco a Sarah, la paciencia y disponibilidad para discutir inmunología y otras cosas que se venían a la cabeza en las jornadas de análisis de datos o clases.

Quiero agradecer a las personas con las cuales he podido compartir durante este último tiempo en el laboratorio, a Justine por las conversaciones que hemos tenido, a Moira, a Juan Pablo, Solange y Viole. Agradezco también a las personas que ya no están en nuestro lab, pero sin duda me ayudaron muchísimo con las cosas que he tratado de hacer, un abrazo a Yessia, Brian y Pedro. A las más recientes incorporaciones de inmunolab, Felipe, Eva, José y Lilian, aprovechen su estadía en el laboratorio. Se aprende muchísimo, siempre hay gente dispuesta a ayudar y se pasa muy bien.

Agradezco en especial a María José Pino (la Coté) y a Paulina, las integrantes del mini-team de lupus. Las preguntas y desafíos en entender que es lo que puede estar pasando siempre ayudan a mirar las cosas de una nueva perspectiva, así que sigamos con eso. Esperemos que lleguen más personas para seguir ampliando el grupo y formamos el sindicato jajaja xd.

Quiero agradecer también de manera especial a Pame, que semana a semana combate mi desorden y siempre tiene algo rico para compartir. También a la Vale, es increíble todos los conocimientos sobre ciencia y la vida que he aprendido al hablar contigo. Los años pandémicos nos tocó trabajar muchísimo y agradezco que seas una excelente compañera con todo el laboratorio. Agradezco a Leo el ser la persona que es, siempre dispuesta ayudarnos y solucionar los problemas que aparecen.

A pesar de los años, sigue teniendo un lugar especial en todo esto la Gaby. Ella me recibió y me ayudó a empezar el trabajo en el mesón, dónde las cosas son de verdad. Las cosas que me mostraste y los datos que generamos juntos han servido para avanzar dos grandes pasos en esta idea de ser científico. Eso es realmente algo invaluable y te mando un gran abrazo.

No puedo no mencionar a Janet Guzmán, la secretaria de postgrado que siempre ha estado disponible para responder mis dudas y ayudarme con mis problemas. Agradecer también a Escuela de postgrado, los Doctores Núñez y Veloso, que me permitieron continuar con mi formación académica.

Un lugar extremadamente especial en todo esto ocupan mi papá y mi mamá. Han sido importantes en permitir hacer las cosas que he intentado hacer. Quiero mandar un gran abrazo a mis hermanas, Paula y Tamara. Ellas han sido una de las principales razones por las cuales no he perdido la cabeza antes. Paula, espero que todo esto alguna vez sirva para algo y podamos estar más tranquilos. Han sido una gran inspiración, escape y apoyo en todos estos años de científico y locura.

A lo largo de estos años, he recibido el apoyo de muchas personas. Han sido el soporte durante los desafíos personales, problemas académicos y cuando la vida se ve realmente difícil. Son una fuente de inspiración y de autodescubrimiento. Un abrazo apretado y espero haber retribuido un poco su cariño, muchas gracias, Pachi, Ochis, Camilo, Luis Felipe, Nati, *Dani Uru*. También al Daniel, Anto, Pau, Tama, Gerardo, Seba, Pap, Coxa, Guti, Tutu y un sorpresivamente largo etc.

Soy una persona muy afortunada, es sorpresivamente larga para mí la lista de personas que puedo agradecer y que me han apoyado, de una u otra forma a avanzar hacia el sitio donde quiero estar. Estos últimos años han estado marcados por la pandemia, que no ha permitido poder compartir y querernos como hubiésemos querido hacerlo, pero espero realmente que el tiempo en adelante sea precisamente para eso. Nos quedan risas, a pesar de todo.

**Dedicado a mi familia y amigos,
afortunadamente ya no se bien dónde va cada cual**
Junio 2022

CONTENIDO

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
Lupus eritematoso sistémico.....	5
Macrófagos y LES.....	6
Cavidad peritoneal y linfocitos B.....	8
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
2.1 Hipótesis.....	10
2.2 Objetivo general.....	10
2.3 Objetivos específicos.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 Animales.....	11
3.2 Obtención de células peritoneales.....	11
3.3 Citometría de flujo multiparamétrica.....	12
3.4 Purificación de células del peritoneo mediante <i>cell sorting</i>	13
3.5 Estimulación de macrófagos <i>in vitro</i>	13
3.6 Ensayo de fagocitosis de timocitos apoptóticos <i>in vivo</i>	14
3.7 Cocultivo de linfocitos B y macrófagos peritoneales.....	14
3.8 ARNseq.....	16
3.9 Análisis estadístico.....	17
IV. RESULTADOS.....	18
4.1 Identificación de poblaciones de células inmunes en el peritoneo.....	18
4.1.1 Identificación de Macrófagos peritoneales.....	20
4.1.2 Identificación de Linfocitos B.....	21
4.1.3 Identificación de Linfocitos T.....	23
4.2 Caracterización de los macrófagos peritoneales.....	25
4.2.1 Alteraciones fenotípicas.....	25
4.2.2 Producción de citoquinas.....	27

4.2.3 Fagocitosis de células apoptóticas	28
4.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la interacción de macrófagos con Linfocitos B peritoneales	31
4.4 Evaluación del perfil transcripcional de los macrófagos peritoneales.....	33
V. DISCUSIÓN.....	36
VI. MODELO RESUMEN VISUAL.....	44
VII. RESUMEN RESULTADOS.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	46
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	47
X. ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Listado de anticuerpos utilizados	12
Tabla 2: Datos de la cohorte de animales analizados.....	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrategia de análisis de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los animales de experimentación.....	19
Figura 2: La cavidad peritoneal de ratones BWF1 enfermos tienen mayor frecuencia de macrófagos peritoneales..	21
Figura 3: El peritoneo de ratones BWF1 enfermos presenta un mayor porcentaje de linfocitos B1a pero un menor porcentaje de linfocitos B totales en comparación a ratones controles.	22
Figura 4: Análisis de linfocitos T en la cavidad peritoneal.....	24
Figura 5: Macrófagos peritoneales de ratones enfermos son fenotípicamente distintos a los obtenidos de ratones controles.	26
Figura 6: Perfil de producción de citoquinas de ratones BWF1 enfermos comparado a controles.	28
Figura 7: Macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos y controles no presentan diferencias significativas en su capacidad fagocítica.	30
Figura 8: Cocultivo de Macrófagos peritoneales y linfocitos B en presencia o ausencia de estímulos.	32
Figura 9: Macrófagos Peritoneales de ratones BWF1 enfermos presentan un perfil transcripcional distinto a controles.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ANAs:	Anticuerpos antinucleares
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>)
BWF1:	Cruza entre ratones NZB hembra y NZW macho
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>
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>)
SLE:	<i>Systemic lupus erythematosus</i>
SLEDAI:	Índice de actividad del 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- β :	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TLR:	Receptor de Tipo Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF- α :	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>

RESUMEN

El Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune con una marcada incidencia en mujeres, que se desarrolla de forma multisistémica y potencialmente fatal. Se caracteriza por la hiperactividad de linfocitos T y B en donde se desarrolla una respuesta inmune contra autoantígenos, mediante la producción de autoanticuerpos contra componentes propios. La hiperactividad está mediada por la presentación de antígenos propios por las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas y los macrófagos.

Las principales funciones de los macrófagos son la fagocitosis de patógenos o células apoptóticas y la secreción de citoquinas y quimioquinas que influyen directamente en la respuesta inmune de otras células, incluyendo la regulación de los linfocitos B. Anormalidades en la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos han sido relacionadas con varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo el LES.

Los macrófagos, junto a los linfocitos B y, especialmente, linfocitos del tipo B1a, son las principales poblaciones inmunes presentes en la cavidad peritoneal. Los macrófagos peritoneales son capaces de modular el comportamiento de los linfocitos B presentes en el peritoneo, por lo cual tiene interés analizar cómo la población de macrófagos peritoneales estaría contribuyendo al desarrollo del LES. La hipótesis de trabajo fue que existen alteraciones fenotípicas y funcionales en los macrófagos peritoneales en el modelo murino de LES (BWF1)

que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Al estudiar la cavidad peritoneal, encontramos una mayor frecuencia de macrófagos peritoneales y células B1a en ratones BWF1 enfermos que en controles de la misma edad. Además, los macrófagos de animales enfermos expresaron niveles más bajos de marcadores funcionales como CD206, MHC-II y SIRP α . También encontramos que los macrófagos de animales enfermos fueron menos eficientes para suprimir la activación y proliferación de linfocitos B activados por LPS en cocultivo en comparación a macrófagos de animales controles. Los experimentos funcionales demuestran que los macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos secretan niveles más altos de citoquinas proinflamatorias cuando se activan con agonistas de TLR7 y TLR9. El análisis de RNAseq identificó 286 genes expresados diferencialmente en macrófagos peritoneales BWF1 enfermos en comparación con ratones control.

En conclusión, en este trabajo demostramos que existen alteraciones en la frecuencia, fenotipo y función de los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal durante el LES que sugieren que los macrófagos peritoneales tendrían un rol relevante en el desarrollo de esta enfermedad.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with a high frequency in women that develops in a multisystemic and potentially fatal way. It is characterized by the hyperactivity of T and B lymphocytes that develop an immune response against autoantigens by producing autoantibodies against their self-components. Hyperactivity is mediated by the presentation of self-antigens by antigen-presenting cells (APC) such as dendritic cells and macrophages.

The primary functions of macrophages include the phagocytosis of pathogens or apoptotic cells and the secretion of cytokines and chemokines that directly influence the immune response, including regulating B cells. Abnormalities in the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages have been linked to several autoimmune and inflammatory diseases, including SLE.

Macrophages, B cells, and B1a cells are the main immune populations present in the peritoneal cavity. Peritoneal macrophages can modulate the behavior of B lymphocytes present in the peritoneum, making these macrophages a relevant population to study during the development of SLE. The hypothesis of this work was that phenotypical and functional alterations of peritoneal macrophages in lupus-prone mice (BWF1) contributed to the development of SLE.

In studying the peritoneal cavity, we found a higher frequency of peritoneal macrophages and B1a cells in diseased BWF1 mice than in age-matched

controls. Furthermore, macrophages from diseased animals expressed lower levels of functional markers CD206, MHC-II, and SIRP α . We also found that macrophages from diseased BWF1 mice were less efficient at suppressing LPS-activated B cell activation and proliferation in co-culture compared to control animals. Functional experiments demonstrate that peritoneal macrophages from diseased BWF1 mice secrete higher levels of proinflammatory cytokines when activated with TLR7 and TLR9 agonists. RNAseq analysis identified 286 differentially expressed genes in diseased BWF1 peritoneal macrophages compared to control mice.

In conclusion, in this work, we show that there are alterations in the frequency, phenotype, and function of macrophages present in the peritoneal cavity during SLE, suggesting that peritoneal macrophages have a relevant role in the development of this disease.

I. INTRODUCCIÓN

Lupus eritematoso sistémico

El Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multisistémica, potencialmente 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 (Kaul et al., 2016; MINSAL, 2013). Actualmente, los tratamientos de última generación para el LES consideran el uso de terapias biológicas basados en anticuerpos que eliminan linfocitos B o el uso de drogas antiinflamatorias e inmunosupresoras que regulan la respuesta inmune. Sin embargo, estos tratamientos son solo paliativos y el LES continúa siendo una enfermedad que aún no tiene cura (Celhar & Fairhurst, 2017; Gatto et al., 2019).

A nivel celular, el LES se caracteriza por la hiperactividad de linfocitos T y B autorreactivos que reconocen autoantígenos nucleares, conocidos como ANAs. Estos anticuerpos pueden reconocer diferentes estructuras como nucleosomas, histonas, proteínas no histonas asociadas a ADN, proteínas asociadas al ARN, entre otros componentes. Este reconocimiento desencadena la respuesta inmune contra estos antígenos propios mediante la producción de autoanticuerpos de alta afinidad y de citoquinas proinflamatorias (Sang et al.,

2014; Suarez-Fueyo et al., 2016). Los autoanticuerpos al unirse al autoantígeno forman complejos inmunes que se depositan en diversos órganos y tejidos, desencadenando el daño tisular característico de esta enfermedad. En el caso del riñón, se produce la nefritis lúpica caracterizada por la deposición inicial de complejos mediados por IgG y proteínas del sistema del complemento derivando en la liberación de proteínas en la orina y el consecuente desarrollo de proteinuria (Davidson, 2016).

Aunque los efectos mediados por la inmunidad adaptativa anteriormente descritos son una parte importante del desarrollo de la enfermedad, estudios en pacientes y modelos murinos sugieren que células de la inmunidad innata, incluidas células dendríticas y macrófagos, están involucrados en la patogenia de la enfermedad (Herrada et al., 2019; Ushio et al., 2017).

Macrófagos y LES

Los macrófagos están involucrados directamente en el inicio de la respuesta inmune siendo el nexo entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La función principal de los macrófagos es fagocitar patógenos o células apoptóticas y la presentación de antígenos (Murray & Wynn, 2011). La correcta eliminación de células apoptóticas por los macrófagos evita la liberación de mediadores proinflamatorios (Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013). La acumulación de remanentes de células apoptóticas podría ser la causa del inicio de enfermedades autoinmunes. El mecanismo propuesto se relaciona con la producción de Interferón de tipo I, activando una respuesta inflamatoria de

linfocitos B y T (Gaipl et al., 2007; Munoz et al., 2010). Aumentos de los niveles plasmáticos de Interferón de tipo I en pacientes de LES se han relacionado con el nivel de actividad de la enfermedad (SLEDAI) (Celhar & Fairhurst, 2017).

Existen evidencias de que los macrófagos tienen una capacidad fagocítica disminuida en pacientes enfermos comparados con controles sanos por lo que esta deficiencia podría ser una consecuencia de la enfermedad (Bijl et al., 2006; Tas et al., 2006). 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).

Recientemente se ha descrito la presencia de macrófagos de origen embrionario no hematopoyético con capacidades de autorrenovarse en el mismo tejido (Davies et al., 2013; Ginhoux et al., 2010; Lavin et al., 2014; Schulz et al., 2012). Este grupo de macrófagos, a los cuales pertenecen los peritoneales, actuarían como centinelas inmunológicos eliminando el debris celular resultante de la respuesta inmune, restableciendo la homeostasis del microambiente de los tejidos (Davies et al., 2013).

Estudios recientes relacionados con el papel de los macrófagos en el LES han mostrado resultados contradictorios, donde la depleción farmacológica de esta población promueve o retrasa la enfermedad (Chalmers et al., 2015; Li et al., 2015). Además, varios grupos han observado alteraciones en el perfil de producción de citoquinas de ratones MRL/Mp y BWF1, dos modelos murinos de

LES (Alleva et al., 1997). Se ha informado que la IL-6 derivada de macrófagos tiene un papel destacado en la promoción de autoanticuerpos anti-ADN en ratones BWF1 propensos al lupus (Alarcon-Riquelme et al., 1993).

Cavidad peritoneal y linfocitos B

La cavidad 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 (van Baal et al., 2017). Las poblaciones más abundantes presentes en esta cavidad son los macrófagos y linfocitos B, siendo la población más numerosa la de los linfocitos B donde el tipo B1a es mayoritario (Bain & Jenkins, 2018; Cassado Ados et al., 2015; Ghosn et al., 2010).

Los linfocitos B1a han sido identificados como productores de autoanticuerpos naturales IgM y se les ha relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Deng et al., 2016; Duan & Morel, 2006; Ochsenbein et al., 1999). Esta clase de anticuerpos se encuentran significativamente aumentados en el modelo murino de Lupus BWF1 (Hayakawa y col., 1986; 1983). Se ha demostrado que los macrófagos peritoneales modulan la proliferación de linfocitos B peritoneales y la migración a la cavidad peritoneal

vía CXCL13 (Ansel et al., 2002; Ito et al., 2004; Okada & Cyster, 2006; Sato et al., 2004).

En conclusión, los macrófagos no solo participan en la fagocitosis y correcta eliminación de células apoptóticas sino que además regulan la proliferación y migración de los linfocitos B en la cavidad peritoneal, sugiriendo una compleja relación entre estas poblaciones celulares.

Pocos estudios han analizado directamente el papel de los macrófagos de la cavidad peritoneal en el LES. Se ha demostrado captación anormal de cuerpos apoptóticos por macrófagos peritoneales de ratones MRL/Mp y además la expresión disminuida de CD206 y menor actividad fagocítica en el modelo B6.MRL-Fas^{lpr} (Deng et al., 2015; Potter et al., 2003).

Sin embargo, las propiedades funcionales de los macrófagos peritoneales en estado estacionario y durante la progresión de esta enfermedad autoinmune siguen estando mal definidas. Dada la interacción entre macrófagos y linfocitos B peritoneales, en este trabajo propusimos estudiar las propiedades funcionales de los macrófagos peritoneales en el modelo murino de LES BWF1, analizando en profundidad el perfil fenotípico de los macrófagos peritoneales y su interacción con los linfocitos B presentes en el peritoneo durante el desarrollo y progresión del lupus eritematoso sistémico.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Alteraciones fenotípicas y funcionales de los macrófagos peritoneales en el modelo murino de LES (BWF1) favorecen el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

2.2 Objetivo general

Caracterizar fenotípica y funcionalmente los macrófagos peritoneales en el modelo murino del LES (BWF1) durante el desarrollo de la enfermedad comparándolos con ratones controles sanos.

2.3 Objetivos específicos

1. Caracterizar e identificar los macrófagos y otras células inmunes presentes en la cavidad peritoneal de ratones BWF1 enfermos y compararlas con células obtenidas de animales controles sanos, mediante citometría de flujo.
2. Comparar la funcionalidad de los macrófagos peritoneales en ratones BWF1 enfermos y ratones controles mediante ensayos de su perfil de producción de citoquinas y capacidad fagocítica.
3. Evaluar *in vitro* la interacción de los macrófagos peritoneales con linfocitos B y su respuesta frente a estímulos tales como LPS, CpG y α CD40+IL-4.
4. Evaluar el perfil transcripcional de macrófagos peritoneales provenientes de ratones BWF1 enfermos y ratones control sanos mediante ARNseq.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

Para abordar los objetivos planteados, se utilizaron hembras del modelo murino de LES [NZBxNZW]F1 (BWF1) provenientes de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Este modelo ha sido ampliamente utilizado para describir la enfermedad (Dixon et al., 1978; Richard & Gilkeson, 2018; Tejon et al., 2019). Como controles se utilizaron hembras de la misma edad de la cruce no autoinmune [NZWxBALB/c] F1 (control), las cuales presentan el mismo haplotipo H-2 que los ratones BWF1. Todos los ratones utilizados en este estudio fueron mantenidos siguiendo los protocolos bioéticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y del bioterio de la Fundación Ciencia & Vida (Santiago, Chile). Se utilizaron hembras BWF1 de 3 y 5 meses para describir un estado previo al desarrollo de la enfermedad autoinmune.

El avance de la enfermedad fue evaluado mediante análisis de proteinuria utilizando tiras reactivas Combur Test N (Roche Diagnostics, Alemania) en conjunto con un análisis en el suero de anticuerpos anti-ADN de doble hebra mediante un ensayo convencional de ELISA (Sauma et al., 2017). Los ratones fueron considerados BWF1 enfermos cuando presentaron 5 g/L de proteinuria durante al menos 3 semanas consecutivas y la presencia de autoanticuerpos.

3.2 Obtención de células peritoneales

El protocolo de obtención de las células peritoneales se realizó de la forma en que se describió anteriormente (Ray & Dittel, 2010). En resumen, se

inyectaron 10 mL de PBS en la cavidad peritoneal y luego de ser distribuido por la cavidad con masajes suaves se recuperó utilizando la misma jeringa. Adicionalmente, se realizan dos lavados del peritoneo con 2 a 3 mL de Verseno con 2% FBS. La suspensión celular se centrifugó a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Se realizó lisis de glóbulos rojos añadiendo al pellet 1 ml de tampón RBC (Biolegend) e incubando en hielo por 5 minutos. Luego de lavar las células, estas fueron resuspendidas en RPMI 1640 10% FBS para el análisis por citometría de flujo o separación mediante *cell sorting*.

3.3 Citometría de flujo multiparamétrica

La suspensión de células peritoneales se distribuyó para realizar el marcaje de las proteínas a analizar mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas en Verseno 2% FBS con el anticuerpo CD16/32 como bloqueador de receptores FcRγII/III e incubadas en hielo por 10 minutos para posteriormente ser incubadas en Verseno 2% FBS durante 20 minutos a 4°C y oscuridad con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos obtenidos de Biolegend (San Diego, USA), mostrados en Tabla 1.

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Antígeno	Fluorocromo	Clon
B220	APC	RA3-6B2	CD4	PE	RM4-5
CD11b	PE	M1-170	CD5	PE-Cy7	53-7.3
CD138	PE	281-2	CD8a	APC/Fire750	53-6.7
CD16/32	-	93	F4/80	APC-Cy7	BM8
CD19	FITC	6D5	F4/80	APC	BM8
CD19	BV421	C068c2	IA-d	AF 647	39-10-8
CD206	PE-Cy7	C068c2	SIRPα	APC	15-414
CD3e	eFluor 660	17A2			

Tabla 1: Listado de anticuerpos utilizados para citometría de flujo en este trabajo.

Se utilizó el reactivo Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience, EE. UU.) o yoduro de propidio (PI) para la discriminación de células vivas/muertas.

La toma de datos se realizó en un citómetro FACSCanto II o FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences), y el análisis de datos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EE. UU.).

3.4 Purificación de células del peritoneo mediante *cell sorting*

Macrófagos y linfocitos B obtenidos de la cavidad peritoneal fueron purificados mediante *cell sorting*. Estas células fueron marcadas utilizando los anticuerpos CD19 BV421, CD11b PE y F4/80 APC para distinguir a ambas poblaciones celulares: Macrófagos (F4/80⁺, CD11b⁺, CD19⁻) y los linfocitos B definidos como (CD11b^{int}, F4/80⁻, CD19⁺). Para realizar el *cell sorting*, las células peritoneales se resuspendió en 3 mL de RPMI 10% FBS, y las células se separaron en el *cell sorter* a una velocidad aproximada de 3.000 eventos por segundo, utilizando el nozzle de 100 µm obteniendo de esta forma una pureza mayor al 95%.

3.5 Estimulación de macrófagos *in vitro*

Los macrófagos peritoneales obtenidos mediante *cell sorting* fueron lavados con penicilina 300 U/ml y estreptomicina 0,3 mg/ml para evitar cualquier contaminación de los cultivos y se resuspendieron en medios de cultivo (RPMI 1640 con FBS al 10 % + β-mercaptoetanol 0,055 µM + Fungizona 0,5 µg /mL).

Los macrófagos se activaron con 1 µg/mL de LPS de E. coli O111:B4 (Sigma-Aldrich), 1 µg/mL de R848 Resiquimod o 10 µg/mL de CpG ODN 1585

(Invivogen) durante la noche a 37°C, en condiciones de atmosfera y humedad controlada al 5% de CO₂. Después de la activación, los sobrenadantes se recolectaron y analizaron con el kit *CBA Mouse inflammation* (BD Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.6 Ensayo de fagocitosis de timocitos apoptóticos *in vivo*

Timocitos provenientes de ratones controles jóvenes fueron cultivados por 12 horas con dexametasona 0,1 mM para inducir la apoptosis. El nivel de apoptosis fue controlado realizando marcaje anexina V/PI donde utilizamos timocitos que presentaban al menos el 80% de las células en apoptosis temprana (Anexina V/PI doble positivas). Los timocitos apoptóticos se tiñeron con CellTrace Violet (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se inyectaron 5x10⁶ Timocitos marcados a ratones BWF1 enfermos y controles de la misma edad. Después de 45 min, se obtuvieron las células peritoneales y se marcaron con anticuerpos para el análisis por citometría de flujo.

3.7 Cocultivo de linfocitos B y macrófagos peritoneales

Macrófagos peritoneales de animales BWF1 enfermos o controles de la misma edad y linfocitos B peritoneales controles fueron purificados mediante *cell sorter* y activados en presencia de estímulos para inducir la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Como control se utilizaron linfocitos B sin la presencia de macrófagos así como también cocultivos sin la presencia de estímulos. Las células fueron preventivamente descontaminadas con RPMI suplementado con Penicilina 300 U/mL y Estreptomina 0,3 mg/mL por 2

minutos, luego se lavaron con RPMI + 10% FBS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, los macrófagos fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI 10% FBS + β -Mercaptoetanol 0,055 μ M + Fungizona 0,5 μ g/mL. La concentración de macrófagos fue ajustada a 400.000 células por mL para poner 50 μ L de la suspensión celular por pozo (20.000 macrófagos) en placa P96 de fondo plano.

Los linfocitos B fueron resuspendidos en PBS para ser marcados con Éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Para esto, se ajustó la concentración a 10×10^6 células por mL y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave con una concentración final de 5 μ M de CFSE. Finalmente, las células ya marcadas se resuspendieron ajustando su concentración a 2×10^6 linfocitos B por mL. Se plaquearon en la placa P96 a razón de 50 μ L (100.000) de Linfocitos B por pozo donde se encontraban los macrófagos.

Los estímulos utilizados, además de la condición control no tratada (NT), fueron 2 ng/mL LPS de E. coli O111:B4 (Sigma-Aldrich), 1 μ g/mL CpG ODN 1826 (Invivogen) o 2 μ g/mL α CD40 + 2 ng/mL IL-4 (Biolegend) para inducir la activación y diferenciación de los linfocitos B (Goldman et al., 2017; Krieg et al., 1995; Pone et al., 2015). Las células se cultivaron durante cuatro días y luego se marcaron para citometría de flujo con CD19, CD138 y colorante de viabilidad para excluir las células muertas. Los ciclos de proliferación se analizaron por citometría de flujo mediante la dilución del colorante fluorescente CFSE.

3.8 ARNseq

El ARN de macrófagos peritoneales aislados por *cell sorting* se extrajo con el reactivo TRIzol (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN purificado se cuantificó con el ensayo Qubit RNA HS (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) y la determinación de la integridad de la muestra se midió con el kit de análisis de ARN de alta sensibilidad (Advanced Analytical Technologies). Las bibliotecas de secuenciación se prepararon utilizando el kit *KAPA Stranded mRNA-Seq* de acuerdo con el protocolo del fabricante (Illumina). La longitud de las bibliotecas se determinó mediante electroforesis capilar utilizando el kit de análisis de fragmentos NGS de sensibilidad estándar (Advanced Analytical Technologies). Las bibliotecas se cuantificaron usando el *KAPA Library Quantification Kit* (Kappa Biosystem) usando el sistema Eco PCR (Illumina), siguiendo el protocolo del fabricante. Las bibliotecas se secuenciaron en una plataforma Miseq (Illumina). El análisis posterior de las lecturas se realizó en R utilizando el paquete Deseq2 para normalizar los datos. Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando un valor de corte de p ajustado de 0,05 y una tasa de cambio mayor a 1,5 veces.

Los datos discutidos en esta publicación han sido depositados en *Gene Expression Omnibus* de NCBI y son accesibles a través del número de acceso GEO Series GSE167108.

3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graph Pad Prism v9.1.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La distribución normal de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre los grupos de datos se calcularon utilizando un ANOVA de una vía o prueba de Freedman o Kruskal-Wallis según corresponda. Las diferencias entre dos grupos se calcularon utilizando t-test no pareado o test no paramétrico de Mann-Whitney. La significancia estadística se representó mediante * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

IV. RESULTADOS

4.1 Identificación de poblaciones de células inmunes en el peritoneo

La cavidad peritoneal posee una gran variedad de células del sistema inmune con funciones esenciales en el control y mantenimiento de la homeostasis tisular. Dentro de estas células, las principales son los macrófagos y los linfocitos B peritoneales (Bain & Jenkins, 2018). Alteraciones en la frecuencia de las poblaciones de las células del sistema inmune podrían relacionarse con el LES por lo cual estudiamos su dinámica durante el desarrollo de la enfermedad.

La Tabla 2 muestra los detalles de la cohorte de estudio, en donde se describen los grupos de estudio utilizados en este trabajo.

	Control 3m	BWF1 3m	Control 5m	BWF1 5m	Control misma edad	BWF1 enfermos
N	3	4	7	4	31	23
Edad (meses) Mediana IQR	2,76 (2,2-3,78)	3,42 (3,06-3,78)	5,36 (4,8-5,82)	5,08 (5,03-5,28)	7,36 (6,64-7,66)	7,17 (6,74-7,63)
Edad (meses) Promedio ± SD	2,91 ± 0,801	3,42 ± 0,416	5,31 ± 0,539	5,13 ± 0,141	7,36 ± 0,958	7,33 ± 0,732

Tabla 2: Datos de la cohorte de animales analizados. Se muestra la Mediana de edad (en meses, m) con el respectivo rango intercuartílico (IQR), además del promedio de edad con su desviación estándar (SD).

A través de citometría de flujo, identificamos las poblaciones de macrófagos, linfocitos B y T dentro de las células obtenidas de la cavidad peritoneal utilizando la estrategia de análisis mostrada en la Figura 1.

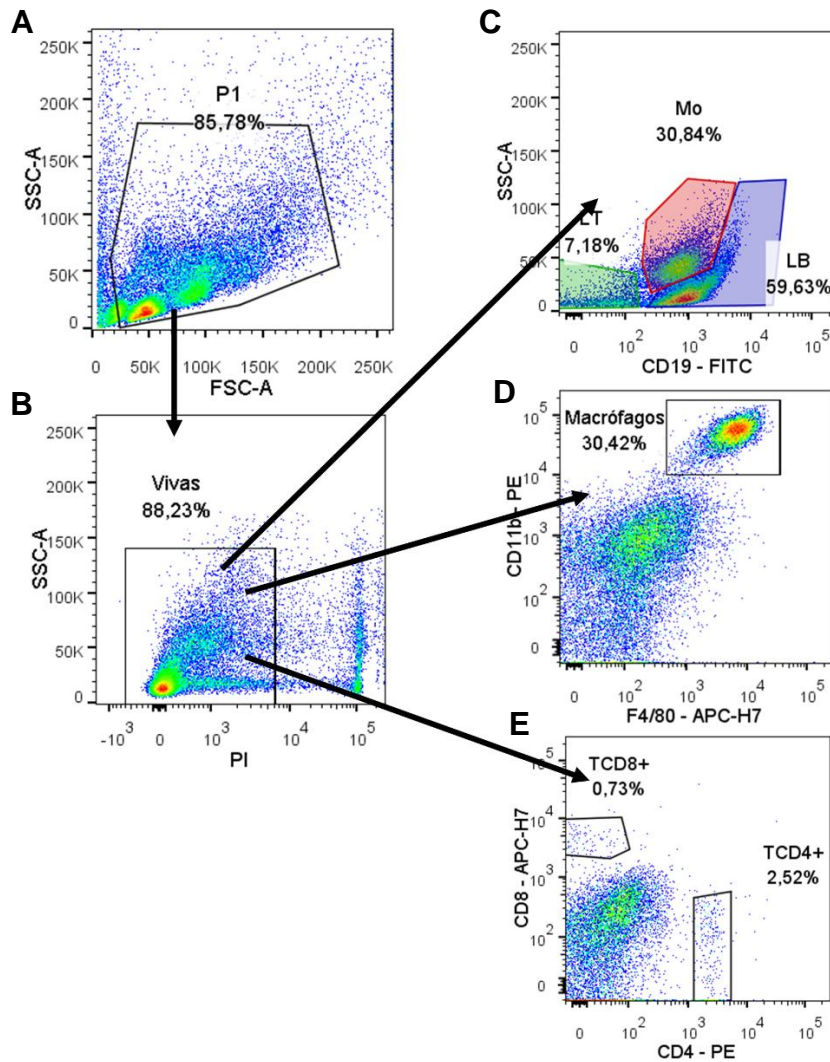


Figura 1: Estrategia de análisis de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los animales de experimentación. Para la identificación de las distintas poblaciones celulares nos basamos en la expresión de marcadores específicos de cada población mediante citometría de flujo. En A se muestra el total de células del peritoneo, en B las células vivas (PI). En C se muestran los linfocitos B (CD19⁺), en D los macrófagos (CD11b⁺ y F4/80⁺) y en E la estrategia para los linfocitos T. Las figuras mostradas corresponden a resultados representativos de un ratón BWF1 enfermo, analizados con FlowJo.

Del total de células vivas, es decir, yoduro de propidio negativas, (Figura 1B), se determinó la frecuencia de macrófagos (Figura 1D), la frecuencia de linfocitos B (Figura 1C) y de linfocitos T CD4 y CD8 presentes en el peritoneo (Figura 1E).

4.1.1 Identificación de Macrófagos peritoneales

Los macrófagos constituyen la segunda mayor población celular descrita en la cavidad peritoneal (Ghosn et al., 2010; Ito et al., 2004). En este trabajo se identificaron por el fenotipo CD11b⁺, CD19⁻ y F4/80⁺, siguiendo la estrategia de análisis descrita en la Figura 1.

En la Figura 2A se presenta un gráfico que muestra el porcentaje de macrófagos peritoneales en los diferentes grupos de animales de experimentación. Se observa que los ratones BWF1 a partir de los 5 meses presentan una frecuencia significativamente mayor de macrófagos peritoneales ($22,2 \pm 5,2\%$) en comparación a los animales controles ($14,1 \pm 1,8\%$). Estas diferencias se acentúan a casi el doble al momento de desarrollar la enfermedad, en donde la frecuencia de macrófagos en los ratones enfermos es de $27,0 \pm 11,6\%$, mientras que la frecuencia obtenida en controles de la misma edad es de $15,9 \pm 4,9\%$.

Cuando evaluamos los macrófagos peritoneales con el transcurso de la edad, observamos que los ratones controles presentan significativamente menos frecuencia de macrófagos peritoneales (Figura 2B), mientras que en los ratones BWF1 esta diferencia no es significativa (Figura 2C).

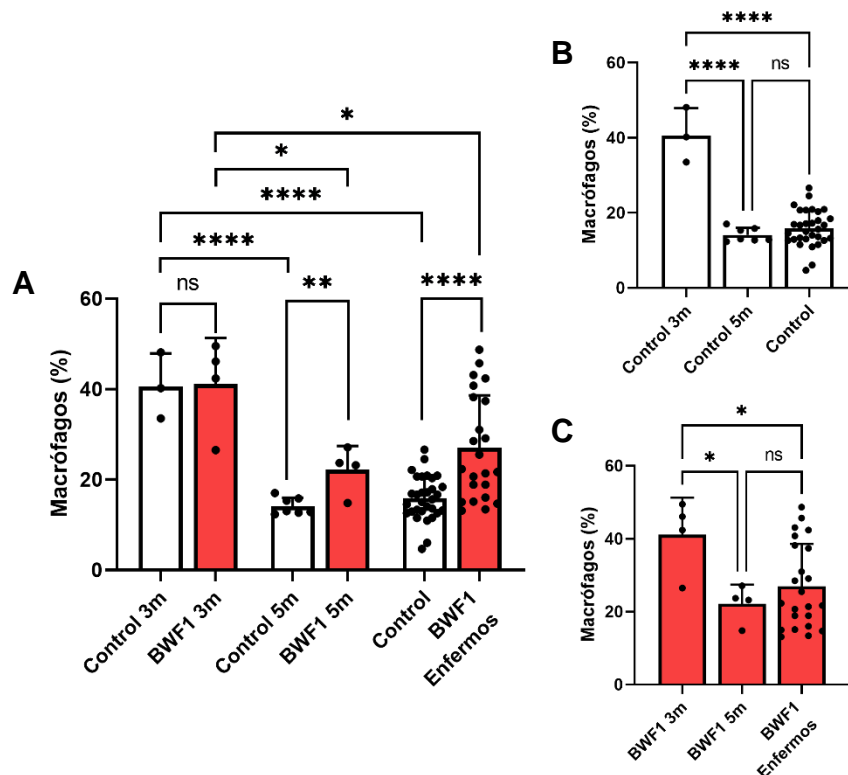


Figura 2: La cavidad peritoneal de ratones BWF1 enfermos tienen mayor frecuencia de macrófagos peritoneales. Porcentaje de macrófagos presentes en la cavidad peritoneal de ratones BWF1 (rojo) y controles (blanco) obtenidos a las edades indicadas. Cada punto representa un ratón, con la barra indicando el promedio y se muestra el error estándar (SD). En A se muestra la totalidad de los animales analizados mientras que en B y C se muestra el detalle para los ratones controles y los BWF1, respectivamente. Utilizando el análisis de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según corresponda, se obtiene la significancia mostrada. Número de ratones por grupo en tabla 2. Valores de P: ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $P < 0,0001$.

4.1.2 Identificación de Linfocitos B

Los linfocitos B son la población más numerosa de la cavidad peritoneal (Ghosn et al., 2010). Los linfocitos B fueron identificados mediante citometría de flujo, utilizando los marcadores CD19+, CD11b^{int} y F4/80-, como se muestra en la Figura 1. Al evaluar los linfocitos B durante el desarrollo de la enfermedad, observamos en la Figura 3, que existen significativamente menos linfocitos B en

los ratones BWF1 enfermos ($64,6 \pm 12,0\%$) que en ratones controles de la misma edad ($73,9 \pm 7,2\%$). Esta diferencia solo se observa cuando comparamos los ratones al momento de desarrollar la enfermedad, ya que tanto a los 3 como a los 5 meses no existen diferencias significativas en el número de linfocitos B totales.

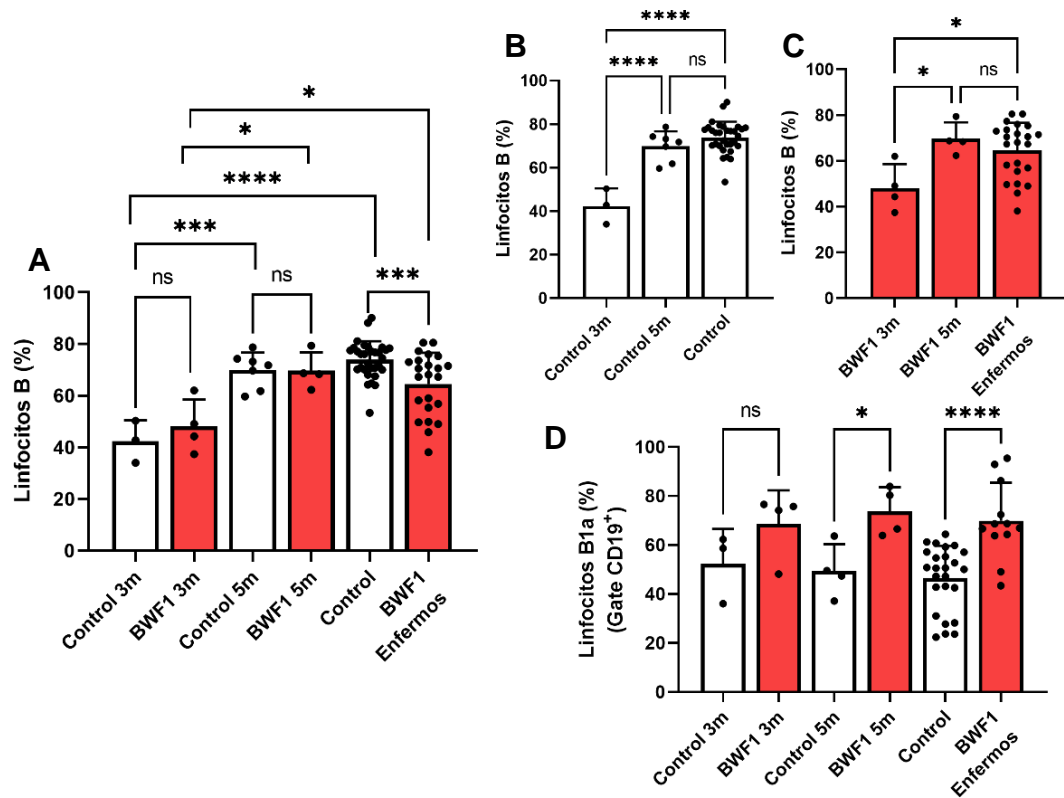


Figura 3: El peritoneo de ratones BWF1 enfermos presenta un mayor porcentaje de linfocitos B1a pero un menor porcentaje de linfocitos B totales en comparación a ratones controles. Frecuencia de linfocitos B presentes en el peritoneo de ratones BWF1 (rojo) y controles (blanco) obtenidos a las edades indicadas. Cada punto representa un ratón, con la barra indicando el promedio y se muestra el error estándar (SD). En A se muestra la totalidad de los animales analizados mientras que en B y C se muestra el detalle para los ratones controles y los BWF1, respectivamente. En D se muestran los valores obtenidos al analizar el marcador CD5, indicativo de células B1a. Utilizando el análisis de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según corresponda, se obtiene la significancia mostrada. Número de ratones por grupo en tabla 2. Valores de P: ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $P < 0,0001$.

Una población relevante de estudio en el contexto de las enfermedades autoinmunes son los linfocitos B1a ya que estas células producen anticuerpos naturales, sin la participación de un antígeno conocido, asociando su fenotipo con la producción de autoanticuerpos (Duan & Morel, 2006; Tumang et al., 2005; Xu et al., 2004). Utilizando el marcador de superficie CD5, es posible identificar los linfocitos B1a del peritoneo. Como se muestra en la Figura 3D, la mayor parte de los linfocitos B presentes en los ratones BWF1 enfermos corresponden a la población de linfocitos B1a ($69,9 \pm 15,61\%$), siendo este valor significativamente mayor a la encontrada en los controles de la misma edad ($46,5 \pm 13,1\%$).

4.1.3 Identificación de Linfocitos T

Los linfocitos T representan menos del 10% de las células del peritoneo. Esta frecuencia es distinta a la encontrada en otros órganos linfoides como el bazo, timo o linfonodos donde se han identificado variaciones dependientes de la cepa estudiada (Composto et al., 2011). Utilizando la estrategia de análisis mostrada en la Figura 1, a través del uso de los marcadores característicos CD4 y CD8, es posible identificar estas diferentes poblaciones de linfocitos T. Como muestra la Figura 4A, en el caso de los linfocitos T CD4⁺ solo existen diferencias significativas al momento del desarrollo de la enfermedad, teniendo significativamente menos frecuencia de linfocitos T CD4⁺ en el peritoneo de animales BWF1 ($1,7 \pm 1,4\%$) al comparar con los ratones controles ($3,2 \pm 1,8\%$).

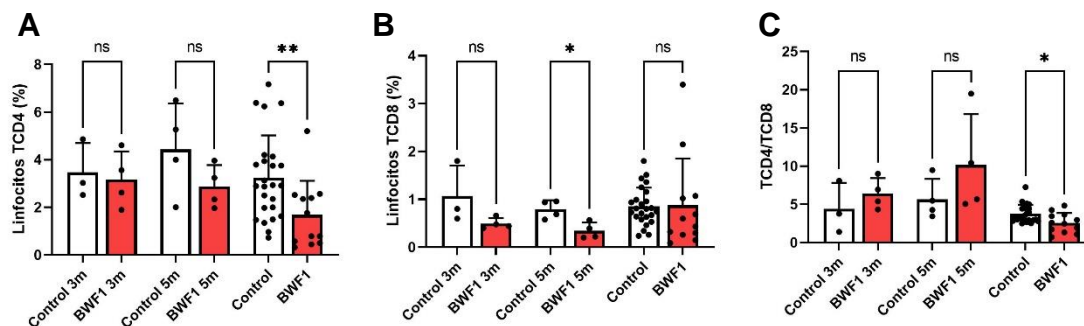


Figura 4: Análisis de linfocitos T en la cavidad peritoneal. Determinación del subtipo de linfocito T presente en la cavidad peritoneal de ratones BWF1 (rojo) y controles (blanco) a las edades especificadas. Se muestra el detalle para los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, mostrados en A y B, respectivamente. En C se muestra la razón entre la frecuencia de los subtipos analizados calculada entre TCD4/TCD8. Cada punto representa un ratón, con la barra indicando promedio y mostrando la desviación estándar (SD). Utilizando el análisis de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según corresponda, se obtiene la significancia mostrada para las comparaciones propuestas. Número de ratones por grupo en tabla 1. Valores de P: ns, p>0,05; *, p<0,05; **, p<0,01.

Al analizar lo que sucede con los linfocitos T CD8⁺ (Figura 4B), existe una diferencia significativa a los 5 meses, en donde los ratones BWF1 5m tienen una menor frecuencia de linfocitos T CD8⁺ ($0,3 \pm 0,1\%$) en comparación a los peritoneos controles ($0,8 \pm 0,2\%$). Sin embargo, debido a las dinámicas poblacionales al momento del desarrollo de la enfermedad, esta diferencia se pierde en ratones más viejos (mayores de 7 meses).

Una forma de comparar la distribución de los dos tipos principales de linfocitos T es la propuesta por Composto y col., en donde se compara la proporción de las frecuencias de las poblaciones TCD4⁺/TCD8⁺ (Composto et al., 2011). En nuestros datos (Figura 4C), esta proporción fue significativamente menor en los BWF1 al momento de presentar la enfermedad, en donde la razón es de $2,6 \pm 1,3$ en comparación a la encontrada en los ratones controles que es $3,8 \pm 1,1$. En el trabajo de Composto, para las cepas ahí estudiadas es menor a

3, excepto en la cepa deficiente de linfocitos B, BALB.xid, con un valor superior a 4 de razón TCD4⁺/TCD8⁺ en el peritoneo (Composto et al., 2011).

4.2 Caracterización de los macrófagos peritoneales

4.2.1 Alteraciones fenotípicas

Con el objetivo de caracterizar a los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal, en paralelo a su identificación, analizamos diferentes marcadores funcionales mediante citometría de flujo. Entre otros, analizamos la expresión de SIRP α , 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.

Como se mostró en los antecedentes, SIRP α está relacionada con la fagocitosis de células apoptóticas mediante la interacción con CD47 produciendo la inhibición de la señal de fagocitosis. Al comparar los grupos, observamos que, si bien no existen diferencias en la frecuencia de macrófagos que expresan el marcador, hay una expresión significativamente menor de SIRP α en los ratones BWF1 enfermos ($1137 \pm 547,3$) en comparación a los controles sanos (1908 ± 811), como se muestra en la Figura 5A.

Diferencias en la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase dos (MHC-II) pueden estar relacionadas con una capacidad diferencial de presentación antigénica, siendo relevante su análisis en el contexto de las enfermedades autoinmunes. En los ratones analizados (Figura 5B), hay significativamente menor frecuencia de macrófagos peritoneales que expresen

MHC-II en los ratones BWF1 ($17,2 \pm 15,8\%$), comparado con los ratones controles ($27,7 \pm 18,6\%$).

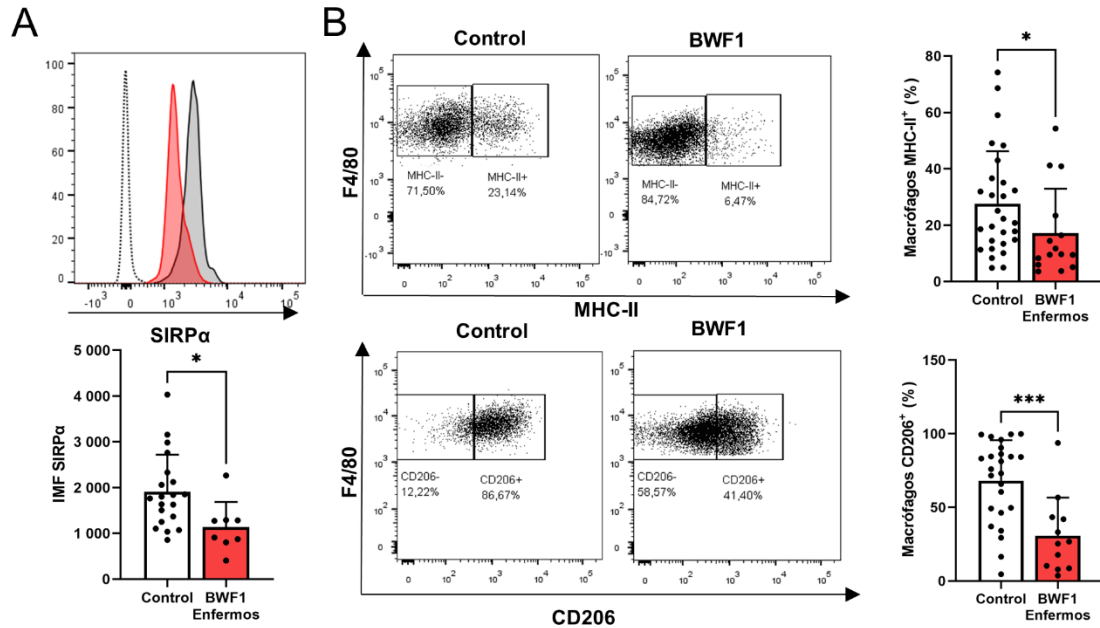


Figura 5: Macrófagos peritoneales de ratones enfermos son fenotípicamente distintos a los obtenidos de ratones controles. En A se muestra la expresión de SIRPα mediante la intensidad media de fluorescencia (IMF) de manera representativa. La línea negra punteada corresponde al control FMO, el histograma negro a los macrófagos controles mientras que el histograma rojo corresponde a ratones BWF1 enfermos. En B se muestran análisis de citometría representativos de las poblaciones de macrófagos que expresan los marcadores MHC-II (arriba) y CD206 (abajo), junto con la respectiva comparación estadística. Cada punto representa un ratón, las barras muestran los promedios con la desviación estándar (SD), siendo las blancas controles y las rojas BWF1. Utilizando análisis no paramétrico t-test o Mann-Whitney, según corresponda se obtiene la significancia mostrada para las comparaciones propuestas. Valores de P: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Para CD206, marcador de polarización hacia macrófagos M2 o alternativamente activados, encontramos que los ratones BWF1 enfermos presentan significativamente menos macrófagos CD206+ ($30,8 \pm 25,8\%$) en comparación al peritoneo de animales controles ($68,1 \pm 27,6\%$).

Estos resultados demuestran que los macrófagos de la cavidad peritoneal de

ratones enfermos de lupus tienen alteraciones fenotípicas significativas en comparación a los existentes en ratones controles.

4.2.2 Producción de citoquinas

Los macrófagos se caracterizan por producir una amplia variedad de citoquinas que varían en relación con el microambiente en donde se encuentran. Los defectos en el patrón normal de citoquinas pueden afectar la defensa del hospedero e inducir el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Kany et al., 2019). Utilizando macrófagos separados mediante *cell sorting*, analizamos el perfil de expresión de citoquinas al exponer las células a LPS, R848 y CpG, conocidos agonistas de los TLR4, TLR7/8 y TLR9 respectivamente.

Al analizar los sobrenadantes de la activación mediante CBA (Figura 6), se observa que los macrófagos de ratones enfermos BWF1 activados con CpG producen significativamente más MCP-1 e IL-6 que los ratones controles. Al evaluar la activación de los TLR7/8 con el uso de R848, observamos que los macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos producen más MCP-1, IL-6 e IL-10 en comparación con los ratones de control. No observamos resultados estadísticamente significativos al estimular con LPS ni encontramos significancia al evaluar la secreción de TNF.

Estos resultados demuestran que los macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos secretan más citoquinas proinflamatorias que los ratones control, teniendo un perfil de secreción significativamente distinto.

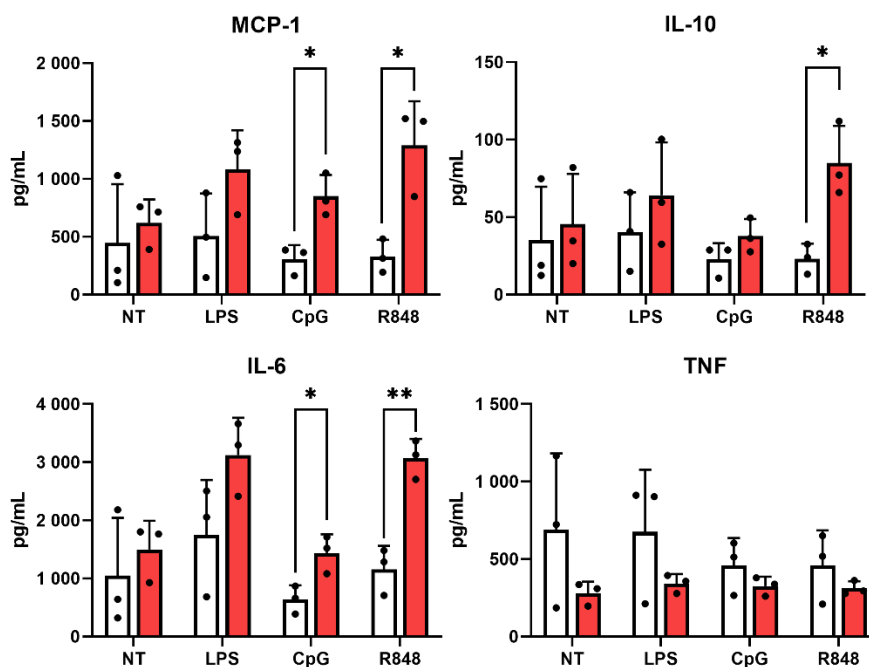


Figura 6: Perfil de producción de citoquinas de ratones BWF1 enfermos comparado a controles. Macrófagos peritoneales provenientes de ratones enfermos (barras rojas) y ratones controles (barra blanca) fueron cultivados por 20 horas en ausencia (NT) o presencia de los activadores mencionados. Cada punto representa un ratón (n=3 por grupo). Mediante ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según corresponda, se obtiene los resultados estadísticamente significativos mostrados Valores de P: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

4.2.3 Fagocitosis de células apoptóticas

La fagocitosis de células y material apoptótico constituye una función principal de los macrófagos. Deficiencias en esta actividad han sido relacionadas con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Bijl et al., 2006; GaipI et al., 2007). Para evaluar la capacidad de fagocitosis de los macrófagos peritoneales, realizamos un ensayo *in vivo*. Timocitos apoptóticos, medidos por marcaje anexina V/PI, provenientes de animales controles marcados con fluorescencia (CellTrace Violet), fueron transferidos mediante inyección intraperitoneal (i.p.) a ratones BWF1 enfermos y a ratones controles de la misma edad. Luego de 45

minutos, se evaluó la fagocitosis de timocitos y la frecuencia de macrófagos que absorbieron células apoptóticas.

Las células recuperadas de la cavidad peritoneal se marcaron con anticuerpos F4/80, CD19, CD4 y CD8. Usando esta estrategia, los timocitos marcados con CTV+ que han sido internalizados por los macrófagos no se teñirán con anticuerpos anti-CD4 y CD8, ya que están dentro de las células y los antígenos CD4 y CD8 no estarán disponibles para la tinción. Por otro lado, los timocitos CTV+ que solo se pegan o se unan a macrófagos serán positivos tanto para F4/80 como para CD4 y CD8. Finalmente, los timocitos CTV+ libres se marcan con anticuerpos CD4 y CD8, pero seguirán siendo negativos para F4/80.

Como se muestra en la Figura 7, no existen diferencias significativas en el porcentaje de timocitos apoptóticos internalizados por los macrófagos en ratones BWF1 enfermos comparado a los controles. Tampoco existe diferencia significativa en el porcentaje de timocitos unidos a macrófagos o los que quedan libres en el peritoneo. Al analizar la frecuencia de fagocitosis por parte de los macrófagos peritoneales, tanto controles como en el peritoneo de ratones BWF1 enfermos, no encontramos diferencias significativas mediante el ensayo realizado.

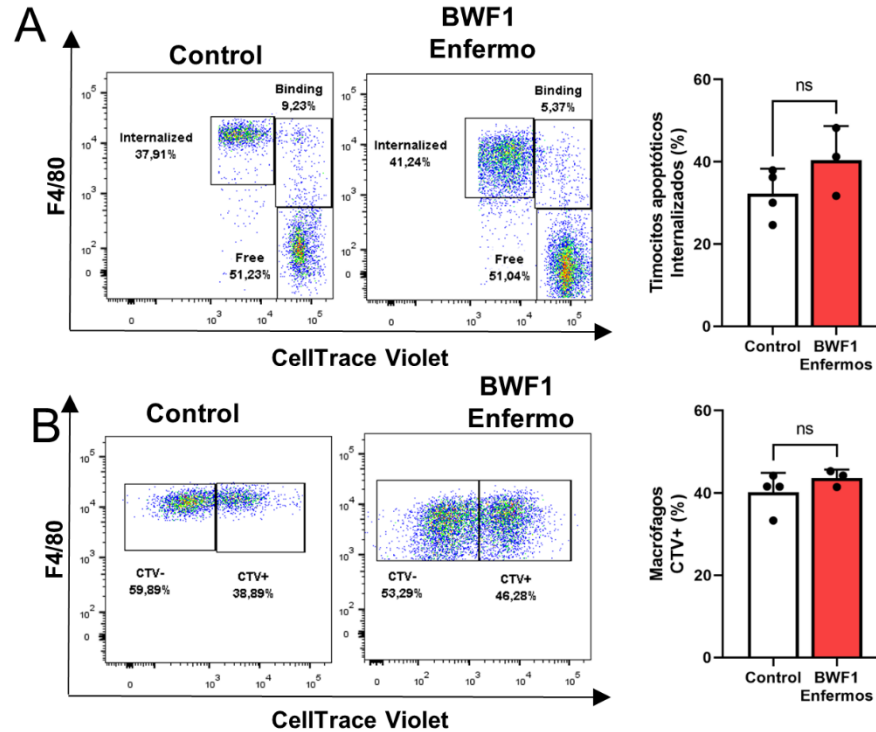


Figura 7: Macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos y controles no presentan diferencias significativas en su capacidad fagocítica. Ensayo de fagocitosis de timocitos apoptóticos de ratones controles marcados con CellTrace Violet (CTV). En A se muestran gráficos representativos del porcentaje de timocitos internalizados o unidos a macrófagos o libres en el peritoneo. El gráfico resume el resultado de timocitos internalizados por macrófagos en el peritoneo control (barra blanca) o en ratones BWF1 enfermos (barra roja). En B se muestra análisis representativo de macrófagos CTV+ que han internalizado timocitos apoptóticos marcados. El análisis de barras resume los macrófagos marcados para el peritoneo control (barra blanca) o BWF1 enfermo (barra roja). Cada punto representa un ratón (n=3-4 ratones por grupo), la barra representa el promedio con su respectiva desviación estándar (SD). T-test paramétrico fue utilizado para el análisis estadístico. ns, $p > 0,05$.

Estos resultados sugieren que, al menos en nuestras condiciones experimentales in vivo, no hay diferencias en la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones BWF1 comparado con ratones controles de la misma edad.

4.3 Evaluación *in vitro* de la interacción de macrófagos con Linfocitos B peritoneales

Los macrófagos provenientes del peritoneo de ratones BWF1 enfermos son fenotípica y funcionalmente distintos en comparación con los obtenidos de animales controles. Fue interesante estudiar el efecto que pueden ejercer sobre el grupo más numeroso de células presentes en la cavidad peritoneal, como son los linfocitos B. Desarrollamos cocultivos de macrófagos aislados mediante cell sorting de peritoneos de ratones BWF1 enfermos y ratones controles en conjunto con linfocitos B controles, en presencia y ausencia estímulos normalmente utilizados para la activación de los linfocitos B. El efecto lo medimos a través del impacto en la diferenciación de los linfocitos B a células preplasmáticas (CD19+ y CD138+) y en la proliferación medida con la dilución de CFSE.

Como se observa en la Figura 9, solo LPS muestra resultados significativos en donde los macrófagos provenientes de animales BWF1 enfermos son capaces de reducir significativamente la diferenciación de linfocitos B (Figura 9A) e inhibir la proliferación de las células marcadas (Figura 9B). Los macrófagos provenientes de animales controles redujeron significativamente la proliferación de los linfocitos B pero no así su diferenciación, en donde se observa solo la tendencia a la baja. Se observa también que los macrófagos provenientes de ratones enfermos BWF1 son significativamente menos eficientes en suprimir la proliferación de los linfocitos B en presencia de LPS que los macrófagos de animales controles.

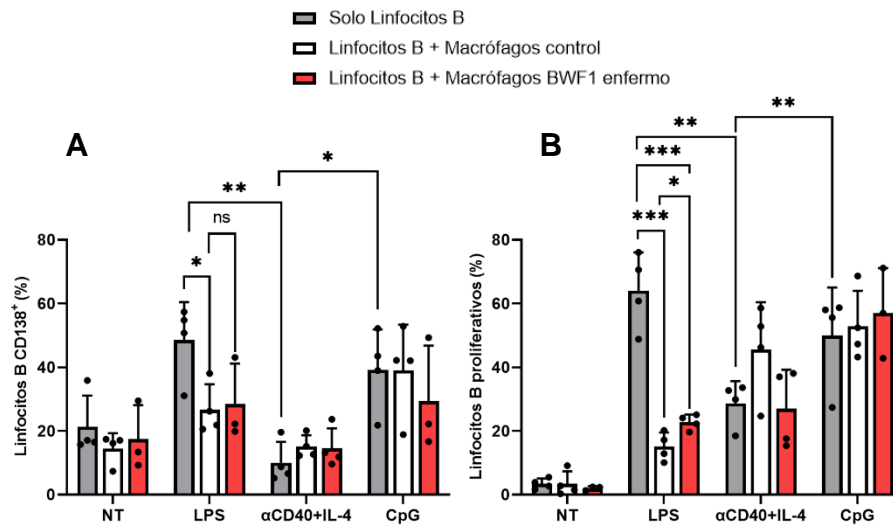


Figura 8: Cocultivo de Macrófagos peritoneales y linfocitos B en presencia o ausencia de estímulos. Linfocitos B de peritoneo control fueron cocultivados en ausencia (barra gris), con macrófagos aislados de animales controles (barras blancas) o ratones BWF1 enfermos (barra roja). En A se muestra el porcentaje de células CD19⁺/CD138⁺ en el cultivo luego de 4 días. En B se muestra la evaluación de la frecuencia de linfocitos B proliferando a través de la dilución de CFSE. En ambos gráficos los puntos representan un cultivo independiente (*n* de 3 o 4), con la barra representando el promedio y se muestra la desviación estándar (SD). Utilizando el análisis de t-test múltiples se obtiene la significancia mostrada. Valores de P: ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

En el cultivo de linfocitos B, observamos que en presencia de LPS y CpG los linfocitos B se activan y se inducen cambios tanto en la diferenciación como en la proliferación. Cuando se cocultivan los linfocitos B con macrófagos peritoneales se suprime la diferenciación y proliferación de estos linfocitos en estas condiciones.

Dado que durante un proceso inflamatorio, tanto los linfocitos B como los macrófagos peritoneales estarán expuestos a diferentes estímulos presentes en el microambiente del peritoneo, por lo tanto estudiarlos en contexto donde el

estímulo puede afectar a ambas poblaciones es relevante para entender la dinámica de regulación que se puede estar dando en la cavidad peritoneal.

4.4 Evaluación del perfil transcripcional de los macrófagos peritoneales

Como se pudo mostrar en las secciones anteriores, existen diferencias significativas en la frecuencia y el fenotipo de los macrófagos de la cavidad peritoneal de animales BWF1 enfermos comparados con controles. Se analizó mediante RNAseq los patrones de expresión génica de macrófagos peritoneales comparándolos entre ambos grupos, control y BWF1 enfermos. El análisis de expresión diferencial considerando una tasa de cambio igual o mayor a 1,5x y un valor de probabilidad ajustado de 0,05 (p-value ajustado), nos lleva a identificar 106 genes regulados al alza y 180 genes regulados a la baja en los macrófagos peritoneales provenientes de ratones BWF1 enfermos, comparado a ratones controles de la misma edad (Figura 9A y material anexo).

Como se muestra en la Figura 9B, el análisis de RNAseq nos permite confirmar que existe una expresión diferencial de CD206 (gen *mrc1*), estando regulado a la baja en macrófagos peritoneales de los ratones BWF1 enfermos al compararlo con los controles sugiriendo una polarización que se alejaría del fenotipo tipo M2.

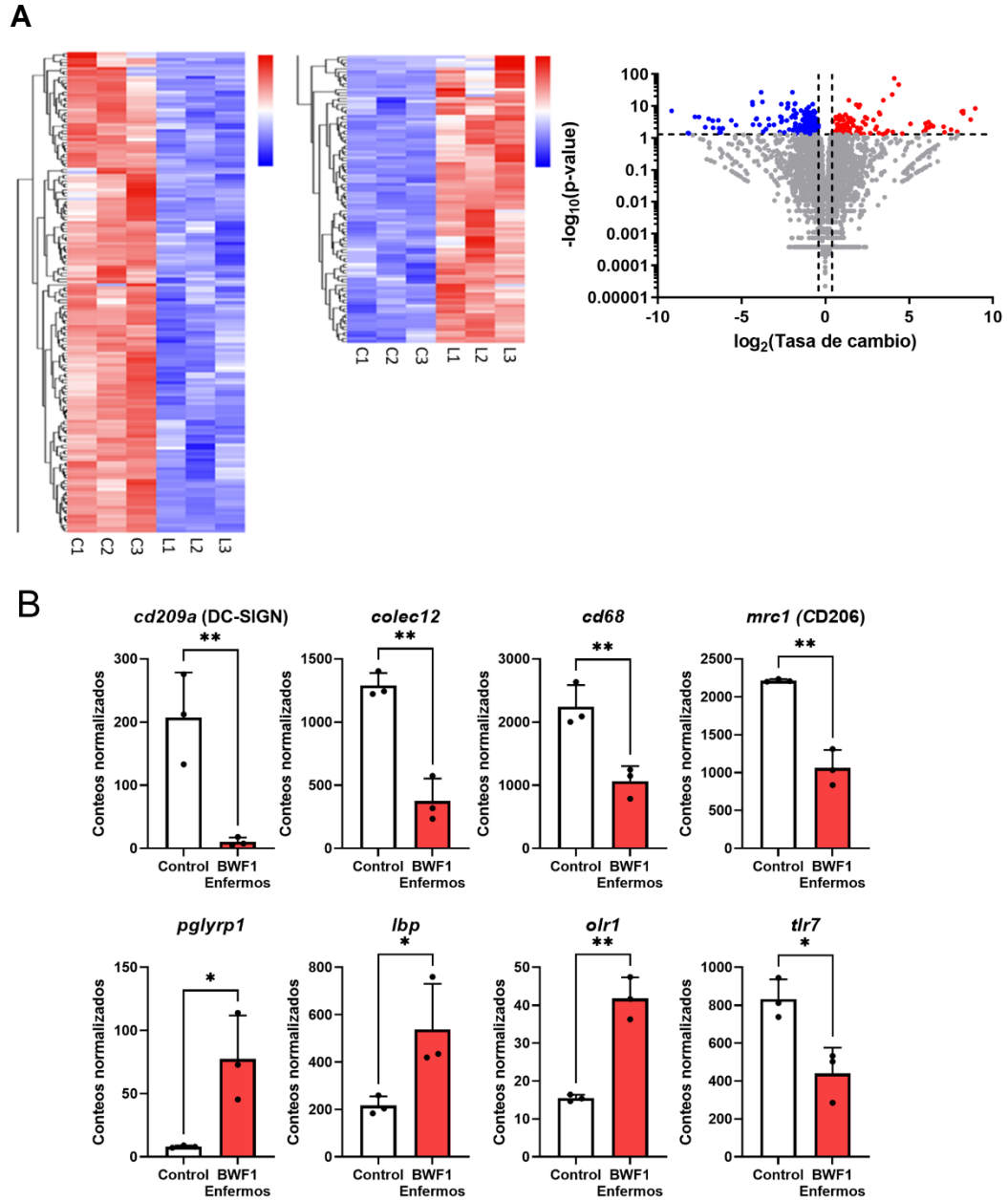


Figura 9: Macrófagos Peritoneales de ratones BWF1 enfermos presentan un perfil transcripcional distinto a controles. Análisis de RNAseq de macrófagos obtenidos desde la cavidad peritoneal de ratones BWF1 enfermos o ratones controles. En A se muestra el mapa de calor de los genes diferencialmente expresados en conjunto con el total de genes analizados mostrados en el volcano-plot en donde rojo significa que están más expresados que la comparación correspondiente. En B se muestran los conteos normalizados para las moléculas diferencialmente expresadas seleccionadas. Cada punto representa un ratón (con n=3), mostrando los ratones BWF1 en la barra roja y los controles en la barra blanca.

Sin embargo, al analizar los genes característicos de M1 como CD86,

CD38, receptor acoplado a proteína G 18 (*gpr18*), receptor de péptido formilo 2 (*fpr2*), *stat1* o los genes exclusivos de M2 como Arg1, proteína de respuesta de crecimiento temprano 2 (*egr2*), *stat6* y *c-Myc* (Jablonski et al., 2015) no se observaron diferencias de expresión génica, por lo cual no se puede determinar que exista una polarización diferencia entre ratones BWF1 enfermos y ratones controles.

Por otro lado, los macrófagos pueden responder a su entorno mediante el empleo de numerosos receptores involucrados en el reconocimiento de moléculas derivadas de patógenos, células apoptóticas y moléculas solubles capaces de inducir programas de activación especializados (Murray & Wynn, 2011). El análisis de RNAseq mostró diferencias significativas en algunos de estos receptores. Entre todos los resultados encontrados, observamos regulados a la baja, es decir, diferencialmente menos expresados en BWF1 en comparación a controles, a los receptores CD209 (*DC-SIGN*), *Colec12*, *CD68* y el receptor de manosa CD206 (Figura 9B). En el grupo de genes expresados en mayor medida en los macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos encontramos a la proteína de reconocimiento de péptidoglicano 1 (*Pglyrp1*), la proteína de unión a lipopolisacáridos (*Lbp*) y receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (*Olr1*).

Estos datos sugieren que los macrófagos peritoneales presentan un perfil transcripcional alterado, lo que puede tener efecto en la forma en que perciben su microambiente y en cómo interactúan con el resto de las células de la cavidad peritoneal.

V. DISCUSIÓN

El Lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos que derivan en estructuras denominadas inmunocomplejos que se depositan en diversos órganos induciendo daño tisular (Kaul et al., 2016). Creciente literatura ha mostrado la necesidad de estudiar el rol del sistema inmune innato en las enfermedades autoinmunes, dominadas por investigaciones ligadas a trastornos de los linfocitos T y B. Los macrófagos están involucrados en muchas enfermedades debido a su función como encargados de la limpieza de las células apoptóticas y el debris celular (Alarcon-Riquelme et al., 1993; Arango Duque & Descoteaux, 2014; GaipI et al., 2007).

Variados estudios indican que los macrófagos de pacientes enfermos de LES serian menos efectivos en la limpieza del debris celular de células apoptóticas, prolongando la exposición de células del sistema inmune autorreactivas frente a potenciales autoantígenos (Bijl et al., 2006; Tas et al., 2006). Estos estudios han sido realizados en macrófagos derivados de monocitos presentes en la sangre periférica u obtenidos con el tratamiento de tioglicolato, que son fenotípica y funcionalmente diferentes de los macrófagos residentes (Pavlou et al., 2017; Zajd et al., 2020). En este trabajo, nos enfocamos en analizar el fenotipo y la función de los macrófagos de la cavidad peritoneal durante la homeostasis y el desarrollo de enfermedades autoinmunes en el modelo murino de lupus BWF1.

Encontramos que la frecuencia de macrófagos en el peritoneo de los ratones

BWF1 enfermos es mayor en comparación a los ratones controles (Figura 2A), incluso antes de que los ratones desarrollen la enfermedad (ratones de 5 meses). Esta mayor frecuencia podría deberse a que el peritoneo de los ratones BWF1 se encuentra inflamado, con señales específicas que pueden promover la proliferación y supervivencia de los macrófagos. Que el cambio sea significativo desde los 5 meses, en donde los ratones BWF1 no presentan proteinuria o daño renal, sugeriría que este fenómeno antecede el inicio de la enfermedad. Por otra parte, la frecuencia de macrófagos peritoneales disminuye significativamente con la edad tanto en ratones controles como en BWF1 (Figura 2B y Figura 2C), siguiendo el comportamiento anteriormente descrito asociado al envejecimiento (Linehan et al., 2014). Sin embargo, se necesitan más experimentos para demostrar la participación de los macrófagos peritoneales en el inicio del LES.

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 Ados et al., 2015; Goldman et al., 2017). Encontramos que en el peritoneo de los ratones BWF1 existe significativamente menor frecuencia de linfocitos B totales en comparación a animales controles (Figura 3A). Al mismo tiempo, observamos una frecuencia significativamente mayor de la subpoblación B1a en la cavidad peritoneal de animales BWF1 enfermos en comparación con los ratones control. Estos linfocitos B1a han sido relacionados con una serie de enfermedades autoinmunes como la anemia hemolítica autoinmune (AHA), el síndrome de Sjögren's y la artritis autoinmune debido a la directa correlación entre el aumento en la frecuencia de estos

linfocitos y la aparición de la enfermedad (Dauphinee et al., 1988; Deng et al., 2016; Hayakawa et al., 1983). El grupo de Murakami informó que la eliminación de linfocitos B1a de la cavidad peritoneal en ratones NZB y BWF1 redujo los anticuerpos anti-ADN en suero y redujo los signos patológicos de LES en el riñón (Murakami et al., 1995).

Los linfocitos B1a peritoneales presentan mayor expresión del receptor CXCR5, que se une a la quimioquina CXCL13 que se propone como producida principalmente por macrófagos de la cavidad peritoneal (Ansel et al., 2002). Esta sobreexpresión ha sido descrita en el microambiente de riñones BWF1 que han desarrollado nefritis lúpica (Ishikawa et al., 2001). 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 et al., 2010).

Es posible que la mayor frecuencia de macrófagos peritoneales en ratones BWF1 pueda explicar la acumulación de células B1a observada en esos ratones. Sin embargo, el análisis realizado mediante ARNseq mostro que los macrófagos de animales BWF1 enfermos tienen una expresión significativamente más baja de CXCL13 (material Anexo). Es necesario analizar en conjunto este resultado con las dinámicas presentes en las poblaciones de linfocitos B debido a que, al incluir el análisis del receptor CXCR5, será posible evaluar de manera correcta el eje de quimioquinas observado. Alteraciones en este eje han sido observadas en trabajos previos de nuestro laboratorio, en donde se observó la acumulación de linfocitos B en el timo de los ratones BWF1 enfermos en comparación a los

ratones controles (Hidalgo et al., 2020).

Al analizar a los linfocitos T, los ratones enfermos presentan significativamente menos linfocitos T CD4⁺ que los ratones controles en el peritoneo. En cambio, en linfocitos T CD8⁺ solo se observan diferencias previo al desarrollo de la enfermedad (Figura 4). 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 proporción 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 et al., 2011).

Al analizar el fenotipo de los macrófagos peritoneales, encontramos significativamente menos expresión de SIRP α , MHC-II y CD206 en los animales BWF1 enfermos comparado con los controles. La significativamente menor Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de SIRP α es relevante ya que se une a la molécula CD47 previniendo la fagocitosis de células propias sanas y el daño tisular (Oldenborg, 2013). Al analizar la expresión de MHC-II encontramos que en la cavidad peritoneal de ratones BWF1 enfermos existe una frecuencia significativamente menor de macrófagos MHC-II⁺ que en la cavidad peritoneal control. Esto podría dar cuenta de alteraciones en la presentación antigénica, como ha sido demostrado en pacientes con LES (Tsokos et al., 1996). En el caso de CD206, encontramos significativamente menos macrófagos que expresen

este receptor de manosa en el peritoneo de animales BWF1 enfermos en comparación a los controles. Se ha reportado que este receptor está disminuido en macrófagos peritoneales y renales de ratones B6.MRL-Fas/lpr en comparación con ratones de control. Además, el mismo grupo ha demostrado que los macrófagos en pacientes con LES expresan niveles más bajos de CD206 en comparación con los controles sanos (Deng et al., 2015).

Los macrófagos son los principales productores de citoquinas y quimioquinas. Su patrón de secreción está ampliamente ligado al microambiente donde se encuentran produciendo una amplia variedad de citoquinas. Estudiamos las citoquinas producidas por macrófagos aislados mediante *cell sorter* en respuesta a diferentes estímulos incluidos los activadores de TLR7 y TLR9 relacionados con el LES (Christensen et al., 2006; Wirth et al., 2019), encontrando que secretan significativamente más MCP-1 e IL-6 los macrófagos provenientes de peritoneos BWF1 en comparación a ratones controles, lo que confirma un fenotipo más proinflamatorio en los macrófagos de animales enfermos. En la literatura se ha informado que la IL-6 está elevada en la sangre de pacientes con LES al mismo tiempo que se ha asociado con la producción de autoanticuerpos y el desarrollo de la enfermedad (Jacob & Stohl, 2011; Ripley et al., 2005). Por otro lado, el aumento de MCP-1 se ha relacionado y propuesto como biomarcador de daño renal para la nefritis lúpica (Lee & Song, 2017). Dado el papel de estas citoquinas en el desarrollo del LES, es posible relacionar el perfil diferencial de producción de citoquinas de los macrófagos peritoneales con el desarrollo de la enfermedad.

Debido a las diferencias observadas en el fenotipo y en la producción de citoquinas de los macrófagos peritoneales, nos preguntamos si existen diferencias en la capacidad fagocítica de estas células. Deficiencias en este mecanismo han sido ligadas a enfermedades inflamatorias y autoinmunes como el LES (Herrmann et al., 1998). Sin embargo, en el experimento de fagocitosis de células apoptóticas desarrollado, no observamos diferencias significativas en la captación de células por parte de los macrófagos peritoneales de la misma edad, enfermos o controles. Se ha especulado en la literatura que la capacidad fagocítica diferencial puede deberse a elementos solubles en el suero como componentes del sistema de complemento, que permiten las diferencias significativas reportadas (Bijl et al., 2006). Es necesario destacar que la mayor parte de los estudios comparando la capacidad fagocítica de las células se desarrollan *in vitro*, utilizando a los macrófagos derivados de monocitos de medula ósea que se han descrito como funcional y fenotípicamente distintos a los presentes en los tejidos (Zajd et al., 2020).

Se ha descrito una clasificación de los macrófagos en base a su forma de activación, las moléculas que presentan y las citoquinas que producen. Esta clasificación divide a los macrófagos en dos grupos, proinflamatorios clásicos (M1) o antiinflamatorios alternativos (M2). *In vitro*, los macrófagos M1 y M2 muestran esta polaridad gracias a las citoquinas utilizadas para generarlos, mientras que *in vivo* existe un espectro de fenotipos con M1 y M2 en los extremos (Accarias et al., 2016; Mantovani et al., 2013). En nuestros datos, se observa que el marcador M2 CD206 significativamente regulado a la baja en ratones

enfermos, sin embargo no existen diferencias en otros marcadores comúnmente asociados al fenotipo M1 o M2 (Jablonski et al., 2015; Martinez et al., 2006). Este resultado respalda la existencia de un amplio espectro de macrófagos dependientes de los estímulos del microambiente peritoneal.

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. Observamos que los macrófagos son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos B, pero los provenientes del peritoneo de ratones BWF1 enfermos fueron menos eficientes.

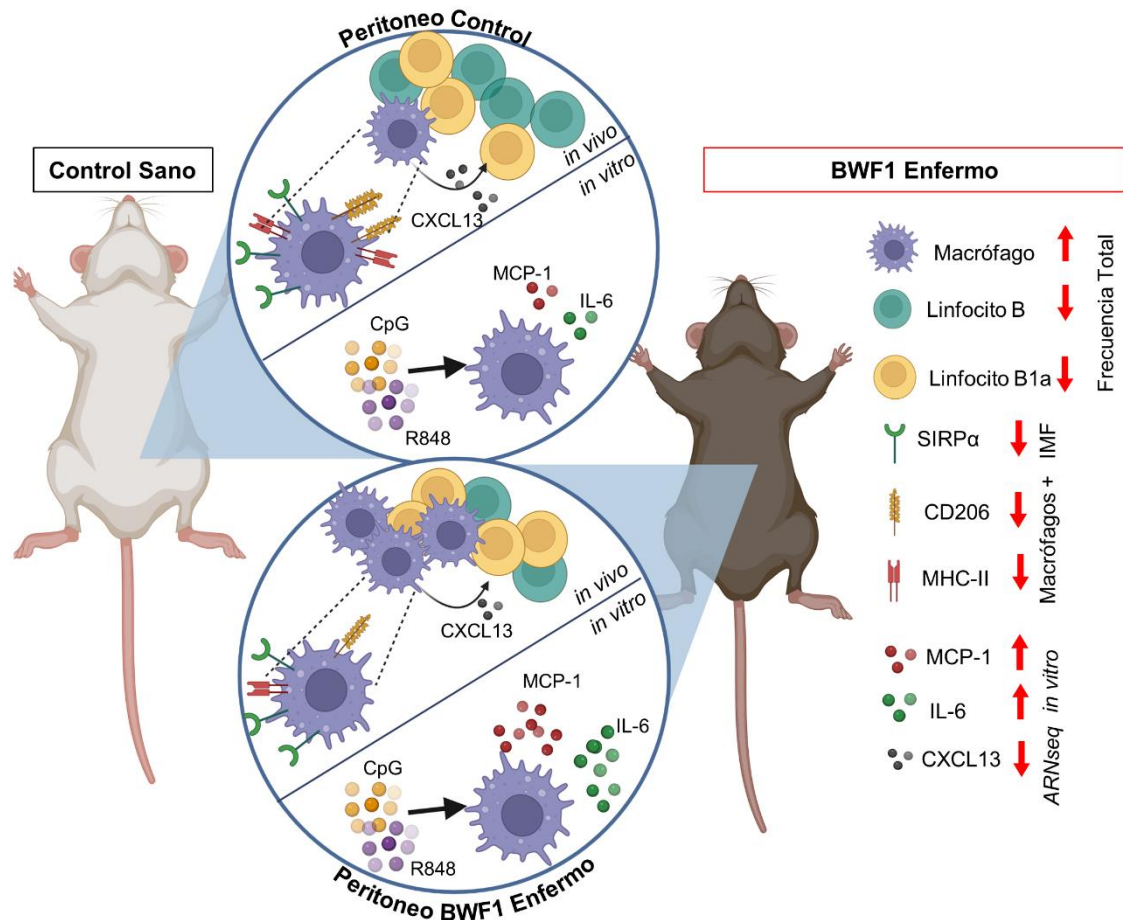
Se ha demostrado en la literatura que los macrófagos peritoneales son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos B inducida por LPS mediante la producción de IL-10 y prostaglandinas. Este efecto no se produce, como en nuestros resultados, al activar a los linfocitos B a través de CD40 (Goldman et al., 2017). Esto sugiere que la inhibición de la proliferación de linfocitos B por parte de los macrófagos depende de las vías de señalización por las que son activados los linfocitos B.

Además del receptor de manosa CD206, en el análisis de RNAseq se encuentran otros receptores de patógenos o restos moleculares diferencialmente expresados. Detectamos que CD209, Colec12 y CD68 estaban regulados a la baja en macrófagos de ratones BWF1 enfermos en comparación a los controles. La lectina de tipo C CD209 está involucrada en el reconocimiento de virus y otros patógenos, mientras que Colec12 y CD68 son receptores que reconocen objetivos de origen exógeno como productos bacterianos y alterados como

moléculas oxidadas o acetiladas (Canton et al., 2013). Dentro de los genes regulados al alza en los ratones BWF1 en comparación a los controles, es decir, los genes que tienen sobreexpresión en contexto de la enfermedad en ratones encontramos a *Pglyrp1*, *Lbp* y *Olr1*. En muestras de suero de pacientes con LES, se ha reportado la sobreexpresión de *Pglyrp1* y también se ha asociado con otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Luo et al., 2019). Adicionalmente, la severidad del lupus se ha asociado a la sobreexpresión de *Olr1* (Sagar et al., 2020).

El conjunto de los resultados analizados sugiere que en la cavidad peritoneal de los ratones BWF1 enfermos, los macrófagos tienen un comportamiento significativamente distinto al observado en los animales controles. Los macrófagos peritoneales de ratones enfermos se comportan de manera más inflamatoria, con la secreción de citoquinas y quimioquinas que contribuyen a la alteración homeostática de los linfocitos B observada en la enfermedad.

VI. MODELO RESUMEN VISUAL



Creado con BioRender.com

En este modelo se recogen los principales hallazgos aportados por este trabajo. Observamos como existen diferencias en la cantidad y frecuencias de las células peritoneales, así como también las alteraciones fenotípicas de los macrófagos. También se observan las diferencias del perfil de citoquinas producido, en cuanto a su cantidad representativa y la alteración del eje de quimioquinas CXCR5/CXCL13.

VII. RESUMEN RESULTADOS

- Ratones BWF1 enfermos presentan frecuencia significativamente mayor de macrófagos peritoneales y de linfocitos B1a pero un menor porcentaje de linfocitos B totales en comparación a ratones controles.
- Los linfocitos TCD4⁺ peritoneales de ratones BWF1 enfermos 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.
- Macrófagos peritoneales de ratones enfermos son fenotípicamente distintos a los macrófagos de ratones controles, en donde tienen menor expresión de SIRP α , y presentan menor proporción de macrófagos MHC-II⁺ y CD206⁺.
- Los macrófagos peritoneales de ratones BWF1 producen significativamente más de las citoquinas proinflamatorias MCP-1 y IL-6 que los animales controles en respuesta a CpG y R848.
- Macrófagos peritoneales de ratones BWF1 y controles no tienen diferencias significativas en su capacidad fagocítica.
- Los macrófagos peritoneales suprimen la proliferación mediada por LPS de linfocitos B peritoneales de ratones controles, siendo los macrófagos provenientes de animales controles más eficientes que los BWF1
- Macrófagos peritoneales de ratones BWF1 enfermos presentan un perfil transcripcional distinto a controles, con 286 genes diferencialmente expresados.

VIII. CONCLUSIONES

El conjunto de los resultados presentados permite concluir que existen diferencias significativas en la población de algunas células del sistema inmune presentes en la cavidad peritoneal de ratones BWF1 respecto a ratones controles al momento de desarrollar la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (LES).

Las alteraciones respecto a la forma en la cual los macrófagos peritoneales interactúan con los linfocitos B, los niveles más altos de citoquinas inflamatorias, el aumento de la frecuencia de macrófagos y las diferencias mostradas en su fenotipo en ratones BWF1 sugieren que en estos animales los macrófagos peritoneales se desplazan hacia un estado más proinflamatorio, que en conjunto con la acumulación preferencial de linfocitos B1a puede promover la progresión de la enfermedad.

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

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Accarias, S., Genthon, C., Rengel, D., Boullier, S., Foucras, G., & Tabouret, G. (2016). Single-cell analysis reveals new subset markers of murine peritoneal macrophages and highlights macrophage dynamics upon *Staphylococcus aureus* peritonitis. *Innate Immun*, 22(5), 382-392. <https://doi.org/10.1177/1753425916651330>
- Alarcon-Riquelme, M. E., Moller, G., & Fernandez, C. (1993). Macrophage depletion decreases IgG anti-DNA in cultures from (NZB x NZW)F1 spleen cells by eliminating the main source of IL-6. *Clin Exp Immunol*, 91(2), 220-225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1993.tb05886.x>
- Alleva, D. G., Kaser, S. B., & Beller, D. I. (1997). Aberrant cytokine expression and autocrine regulation characterize macrophages from young MRL+/+ and NZB/W F1 lupus-prone mice. *The Journal of Immunology*, 159(11), 5610-5619. <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/159/11/5610.full.pdf>
- 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)
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Bain, C. C., & Jenkins, S. J. (2018). The biology of serous cavity macrophages. *Cell Immunol*, 330, 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.003>
- Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P. C., & Kallenberg, C. G. (2006). Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis*, 65(1), 57-63. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.035733>
- Canton, J., Neculai, D., & Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(9), 621-634. <https://doi.org/10.1038/nri3515>
- Cassado Ados, A., D'Imperio Lima, M. R., & Bortoluci, K. R. (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol*, 6, 225. <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)*, 56(suppl_1), i88-i99. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew400>
- Chalmers, S. A., Chitu, V., Herlitz, L. C., Sahu, R., Stanley, E. R., & Putterman, C. (2015). Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies. *J Autoimmun*, 57, 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.11.007>
- Christensen, S. R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. A., &

- Shlomchik, M. J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*, 25(3), 417-428. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.013>
- Composto, G., Gonzalez, D., Bucknum, A., Silberman, D., Taylor, J., Kozlowski, M., Bloomfield, T., Bartlett, T., & 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>
- Dauphinee, M., Tovar, Z., & Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 31(5), 642-647. <https://doi.org/10.1002/art.1780310509>
- Davidson, A. (2016). What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nat Rev Rheumatol*, 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. *Nat Immunol*, 14(10), 986-995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- Deng, J., Wang, X., Chen, Q., Sun, X., Xiao, F., Ko, K. H., Zhang, M., & Lu, L. (2016). B1a cells play a pathogenic role in the development of autoimmune arthritis. *Oncotarget*, 7(15), 19299-19311. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8244>
- Deng, W., Chen, W., Zhang, Z., Huang, S., Kong, W., Sun, Y., Tang, X., Yao, G., Feng, X., Chen, W., & Sun, L. (2015). Mesenchymal stem cells promote CD206 expression and phagocytic activity of macrophages through IL-6 in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, 161(2), 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.07.011>
- 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 Rheum*, 21(5 Suppl), S64-67. <https://doi.org/10.1002/art.1780210909>
- Duan, B., & Morel, L. (2006). Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 5(6), 403-408. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.10.007>
- Gaipl, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R. E., Winkler, T., Kuhn, A., Kalden, J., Kern, P., & Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun*, 28(2-3), 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.005>
- Gatto, M., Zen, M., Iaccarino, L., & Doria, A. (2019). New therapeutic strategies in systemic lupus erythematosus management. *Nat Rev Rheumatol*, 15(1), 30-48. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0133-2>
- Ghosh, E. E., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., Bortoluci, K. R., Almeida, S. R., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(6), 2568-2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad,

- M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. <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. *Cell Immunol*, 314, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.002>
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R., & Herzenberg, L. A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med*, 157(1), 202-218. <https://doi.org/10.1084/jem.157.1.202>
- Herrada, A. A., Escobedo, N., Iruretagoyena, M., Valenzuela, R. A., Burgos, P. I., Cuitino, L., & Llanos, C. (2019). Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*, 10, 772. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00772>
- Herrmann, M., Voll, R. E., Zoller, O. M., Hagenhofer, M., Ponner, B. B., & Kalden, J. R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 41(7), 1241-1250. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199807\)41:7<1241::AID-ART15>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199807)41:7<1241::AID-ART15>3.0.CO;2-H)
- Hidalgo, Y., Nunez, S., Fuenzalida, M. J., Flores-Santibanez, F., Saez, P. J., Dorner, J., Lennon-Dumenil, A. M., Martinez, V., Zorn, E., Roseblatt, M., Sauma, D., & Bono, M. R. (2020). Thymic B Cells Promote Germinal Center-Like Structures and the Expansion of Follicular Helper T Cells in Lupus-Prone Mice. *Front Immunol*, 11, 696. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00696>
- Hochreiter-Hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1), a008748. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008748>
- Ishikawa, S., Sato, T., Abe, M., Nagai, S., Onai, N., Yoneyama, H., Zhang, Y., Suzuki, T., Hashimoto, S., Shirai, T., Lipp, M., & Matsushima, K. (2001). Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J Exp Med*, 193(12), 1393-1402. <https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1393>
- Ito, T., Ishikawa, S., Sato, T., Akadegawa, K., Yurino, H., Kitabatake, M., Hontsu, S., Ezaki, T., Kimura, H., & Matsushima, K. (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. *J Immunol*, 172(6), 3628-3634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3628>
- Jablonski, K. A., Amici, S. A., Webb, L. M., Ruiz-Rosado Jde, D., Popovich, P. G., Partida-Sanchez, S., & Guerau-de-Arellano, M. (2015). Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*, 10(12), e0145342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>
- Jacob, N., & Stohl, W. (2011). Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 13(4), 228.

- <https://doi.org/10.1186/ar3349>
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., & Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16039. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.39>
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., & Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., & Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, 159(6), 1312-1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>
- Lee, Y. H., & Song, G. G. (2017). Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol*, 76(4), 357-363. <https://doi.org/10.1007/s00393-016-0109-z> (MCP-1 im Urin als Biomarker bei Lupusnephritis: eine Metaanalyse.)
- Li, F., Yang, Y., Zhu, X., Huang, L., & Xu, J. (2015). Macrophage Polarization Modulates Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Physiol Biochem*, 37(4), 1279-1288. <https://doi.org/10.1159/000430251>
- Linehan, E., Dombrowski, Y., Snoddy, R., Fallon, P. G., Kissenpfennig, A., & Fitzgerald, D. C. (2014). Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell*, 13(4), 699-708. <https://doi.org/10.1111/accel.12223>
- Luo, Q., Li, X., Zhang, L., Yao, F., Deng, Z., Qing, C., Su, R., Xu, J., Guo, Y., Huang, Z., & Li, J. (2019). Serum PGLYRP1 is a highly discriminatory biomarker for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*, 19(1), 589-594. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9632>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*, 229(2), 176-185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*, 177(10), 7303-7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
- [Record #95 is using a reference type undefined in this output style.]
- Munoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*, 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. *Int Immunol*, 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. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 723-737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Ochsenbein, A. F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (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>
- Okada, T., & Cyster, J. G. (2006). B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr Opin Immunol*, 18(3), 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.02.005>
- Oldenborg, P. A. (2013). CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol*, 2013, 614619. <https://doi.org/10.1155/2013/614619>
- Pavlou, S., Wang, L., Xu, H., & Chen, M. (2017). Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *J Inflamm (Lond)*, 14, 4. <https://doi.org/10.1186/s12950-017-0151-x>
- Pone, E. J., Lou, Z., Lam, T., Greenberg, M. L., Wang, R., Xu, Z., & Casali, P. (2015). B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. *Autoimmunity*, 48(1), 1-12. <https://doi.org/10.3109/08916934.2014.993027>
- Potter, P. K., Cortes-Hernandez, J., Quartier, P., Botto, M., & Walport, M. J. (2003). Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J Immunol*, 170(6), 3223-3232. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3223>
- Ray, A., & Dittel, B. N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*(35). <https://doi.org/10.3791/1488>
- Richard, M. L., & Gilkeson, G. (2018). Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci Med*, 5(1), e000199. <https://doi.org/10.1136/lupus-2016-000199>
- Ripley, B. J., Goncalves, B., Isenberg, D. A., Latchman, D. S., & Rahman, A. (2005). Raised levels of interleukin 6 in systemic lupus erythematosus correlate with anaemia. *Ann Rheum Dis*, 64(6), 849-853. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.022681>
- Sagar, D., Gaddipati, R., Ongstad, E. L., Bhagroo, N., An, L. L., Wang, J., Belkhdja, M., Rahman, S., Manna, Z., Davis, M. A., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Grimsby, J., Kolbeck, R., Karathanasis, S., Sims, G. P., & Gupta, R. (2020). LOX-1: A potential driver of cardiovascular risk in SLE patients. *PLoS One*, 15(3), e0229184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229184>
- Sang, A., Zheng, Y. Y., & Morel, L. (2014). Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Mol Immunol*, 62(2), 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.013>

- Sato, T., Ishikawa, S., Akadegawa, K., Ito, T., Yurino, H., Kitabatake, M., Yoneyama, H., & Matsushima, K. (2004). Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur J Immunol*, 34(12), 3346-3358. <https://doi.org/10.1002/eji.200425373>
- Sauma, D., Crisostomo, N., Fuentes, C., Gleisner, M. A., Hidalgo, Y., Fuenzalida, M. J., Roseblatt, M., & Bono, M. R. (2017). Adoptive transfer of autoimmune splenic dendritic cells to lupus-prone mice triggers a B lymphocyte humoral response. *Immunol Res*, 65(4), 957-968. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8936-9>
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 336(6077), 86-90. <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. *Nat Rev Immunol*, 1(2), 147-153. <https://doi.org/10.1038/35100573>
- Suarez-Fueyo, A., Bradley, S. J., & Tsokos, G. C. (2016). T cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Opin Immunol*, 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. *Ann Rheum Dis*, 65(2), 216-221. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.037143>
- Tejon, G., Hidalgo, Y., Bono, M. R., & Roseblatt, M. (2019). A Spontaneous Mouse Model of Lupus: Physiology and Therapy. In S. Lionaki (Ed.), *Lupus: New Advances and Challenges*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85938>
- Tsokos, G. C., Kovacs, B., Sfikakis, P. P., Theocharis, S., Vogelgesang, S., & Via, C. S. (1996). Defective antigen-presenting cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 39(4), 600-609. <https://doi.org/10.1002/art.1780390409>
- Tumang, J. R., Frances, R., Yeo, S. G., & Rothstein, T. L. (2005). Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol*, 174(6), 3173-3177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3173>
- Ushio, A., Arakaki, R., Yamada, A., Saito, M., Tsunematsu, T., Kudo, Y., & Ishimaru, N. (2017). Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. *World Journal of Immunology*, 7(1). <https://doi.org/10.5411/wji.v7.i1.1>
- van Baal, J. O., Van de Vijver, K. K., Nieuwland, R., van Noorden, C. J., van Driel, W. J., Sturk, A., Kenter, G. G., Rikkert, L. G., & Lok, C. A. (2017). The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell*, 49(1), 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.11.004>

- Wirth, J. R., Molano, I., Ruiz, P., Coutermarsh-Ott, S., & Cunningham, M. A. (2019). TLR7 Agonism Accelerates Disease and Causes a Fatal Myeloproliferative Disorder in NZM 2410 Lupus Mice. *Front Immunol*, 10, 3054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03054>
- Wong, C. K., Wong, P. T., Tam, L. S., Li, E. K., Chen, D. P., & Lam, C. W. (2010). Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J Clin Immunol*, 30(1), 45-52. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9325-5>
- 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. *J Immunol*, 173(10), 6050-6058. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6050>
- Zajd, C. M., Ziemba, A. M., Miralles, G. M., Nguyen, T., Feustel, P. J., Dunn, S. M., Gilbert, R. J., & Lennartz, M. R. (2020). Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used. *Front Immunol*, 11, 269. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00269>

X. ANEXOS

Tabla anexa 1: Lista de los 106 genes sobre expresados en macrófagos peritoneales BWF1 en comparación a controles de la misma edad.

MGI	log2FC	adj. P.Val	MGI	log2FC	adj. P.Val	MGI	log2FC	adj. P.Val
Cnbd2	4,120	1,E-74	Orm1	5,982	2,E-03	Appl2	0,874	2,E-02
Cavin1	4,382	8,E-48	Ahcy	5,081	2,E-03	Ikbke	0,790	2,E-02
Tmem154	3,998	1,E-23	Ier2	0,747	2,E-03	Phc3	0,675	2,E-02
S1pr5	1,405	7,E-16	F7	0,707	2,E-03	Pogz	5,871	3,E-02
Cd52	3,460	8,E-16	Coro1a	2,409	2,E-03	Ckap5	7,869	3,E-02
Slc1a5	1,846	9,E-12	Fmn1	1,209	3,E-03	Orm2	4,024	3,E-02
Sell	2,065	2,E-11	Dyrk1a	6,289	3,E-03	Clec4e	0,550	3,E-02
Hp	1,995	6,E-10	Lbp	1,316	3,E-03	Prcp	0,505	3,E-02
Col22a1	8,954	4,E-09	H13	1,015	3,E-03	Chsy1	1,859	3,E-02
Slc4a5	8,232	1,E-07	Siglece	1,684	4,E-03	Arl14ep	1,212	3,E-02
Gpr132	8,141	2,E-07	Gigyf2	1,138	4,E-03	Rassf5	0,600	3,E-02
Mmp14	3,221	6,E-07	Rsad1	6,433	5,E-03	Fblim1	1,270	3,E-02
Tstd2	8,227	1,E-06	Fosb	7,058	5,E-03	Arid3a	0,931	3,E-02
Pglyrp1	3,261	3,E-06	Sla	1,125	5,E-03	Sh3pxd2a	7,114	3,E-02
Tmem176b	1,206	4,E-06	Rnf150	3,066	6,E-03	Ntn4	1,996	4,E-02
Junb	0,854	8,E-06	Tgm2	1,207	6,E-03	Itgb5	3,626	4,E-02
Leng8	0,625	3,E-05	C3	1,222	7,E-03	Rps6	1,032	4,E-02
Sbno2	1,016	3,E-05	Zfp420	6,195	7,E-03	Enpp4	1,195	4,E-02
Ids	2,384	3,E-05	Efnb2	0,882	8,E-03	Rflnb	3,197	4,E-02
Sh3bgrl3	0,678	4,E-05	Bace1	6,039	8,E-03	Zfp595	2,089	4,E-02
Rpl30	1,345	5,E-05	Acvr1	1,011	8,E-03	Casp8ap2	0,664	4,E-02
Itga5	1,507	7,E-05	Rps6ka1	0,740	8,E-03	Ptprv	2,687	4,E-02
Rps6kb1	2,486	9,E-05	Ptprs	1,920	8,E-03	P2rx1	1,471	4,E-02
Ptges	1,014	9,E-05	Fos	2,104	9,E-03	Myo18a	1,237	4,E-02
Wipf1	0,676	1,E-04	Rfx1	1,456	1,E-02	Ccdc88b	0,929	4,E-02
Cd9	1,421	1,E-04	Marveld1	0,785	1,E-02	Smad5	0,731	4,E-02
Chil1	8,676	2,E-04	Nhlrc2	2,123	1,E-02	Prr14l	4,590	4,E-02
Thbs1	2,877	2,E-04	Htra3	0,714	1,E-02	Tmem176a	0,963	5,E-02
Plxnd1	1,099	2,E-04	Cdc14a	1,147	1,E-02	Clec5a	2,300	5,E-02
Hnrnpa2b1	0,871	3,E-04	Bicra	2,990	1,E-02	Dlg3	1,867	5,E-02
S100a6	1,688	3,E-04	Arhgap26	7,507	2,E-02	Lyl1	0,826	5,E-02
Rnf217	2,253	6,E-04	Rpl6	0,707	2,E-02	Prok2	3,444	5,E-02
Rasgrp2	6,164	7,E-04	Ace	1,956	2,E-02	Gmip	0,733	5,E-02
Tspan32	1,562	8,E-04	Nckap1	5,978	2,E-02	Gtf3c4	0,596	5,E-02
Mknk2	1,337	9,E-04	Olr1	1,427	2,E-02			
Slc16a3	1,583	1,E-03	Serpine1	3,730	2,E-02			

Tabla anexa 2: Lista de los 180 genes con menos expresión en macrófagos peritoneales BWF1 en comparación a controles de la misma edad.

MGI	log2FC	adj. P.Val	MGI	log2FC	adj. P.Val	MGI	log2FC	adj. P.Val
Ppfibp1	-1,961	1,E-27	Cep290	-6,384	3,E-04	Serpib8	-0,616	1,E-02
Cgn1	-3,825	1,E-27	Tceanc2	-2,291	3,E-04	Bank1	-0,710	1,E-02
Zfp991	-3,747	3,E-14	Zscan25	-6,711	3,E-04	Ccl24	-1,608	1,E-02
Apoc2	-4,346	7,E-14	Rreb1	-2,585	3,E-04	Ap1b1	-1,715	1,E-02
Dpp7	-1,793	1,E-12	Tfe3	-0,937	4,E-04	Rab31	-0,494	1,E-02
Hal	-2,231	1,E-12	Hexa	-0,743	5,E-04	Calm2	-0,667	1,E-02
Epas1	-1,815	3,E-12	Rab11a	-0,605	5,E-04	Gimp	-0,571	1,E-02
Pmp22	-0,752	4,E-12	Renbp	-1,226	5,E-04	Gja1	-3,538	1,E-02
Glb1	-2,623	4,E-12	Rtf2	-0,623	6,E-04	Wwp2	-0,818	1,E-02
Cd209a	-4,336	1,E-11	Micu1	-0,848	6,E-04	Rab3d	-1,541	1,E-02
Hpse	-0,984	4,E-10	Cbr2	-2,629	7,E-04	Hist1h2bc	-2,146	1,E-02
Fcgr2b	-2,226	4,E-10	Nagk	-1,144	7,E-04	Gla	-0,986	2,E-02
Lgals1	-2,275	3,E-09	P2ry14	-1,203	7,E-04	Slc36a1	-0,958	2,E-02
Dnase2a	-1,120	1,E-08	Ctsd	-0,941	1,E-03	Ergic3	-0,724	2,E-02
Zfp984	-1,868	4,E-08	Vopp1	-0,868	1,E-03	Hebp1	-0,974	2,E-02
Uap1l1	-1,453	6,E-08	Atp6v0a1	-0,880	1,E-03	Mfsd1	-0,655	2,E-02
Ifi44l	-9,170	9,E-08	Lgmn	-0,928	1,E-03	Cd300ld3	-0,713	2,E-02
Atp6v1a	-0,668	9,E-08	Igf1	-1,787	1,E-03	Sfrp1	-1,941	2,E-02
Lilr4b	-1,023	2,E-07	Trf	-0,819	2,E-03	Haus2	-0,807	2,E-02
Dynlt1c	-1,243	4,E-07	Wfdc17	-1,219	2,E-03	Pyroxd2	-0,717	2,E-02
Anxa7	-0,776	4,E-07	Lancl1	-1,069	2,E-03	Fcna	-0,749	2,E-02
Atp6v1b2	-0,621	4,E-07	Ivns1abp	-0,806	2,E-03	Gnaq	-0,479	2,E-02
Grn	-0,615	6,E-07	Arg2	-4,321	2,E-03	Cdkn2b	-1,693	2,E-02
Gm15922	-0,907	1,E-06	Gba	-1,095	3,E-03	Icam2	-0,573	2,E-02
Pianp	-1,723	1,E-06	Enpp1	-3,928	3,E-03	Acss1	-1,034	2,E-02
Rftn1	-1,259	3,E-06	Pald	-3,065	3,E-03	Pilrb1	-1,265	2,E-02
Oxct1	-0,944	5,E-06	Cd63	-1,525	3,E-03	Rora	-1,001	2,E-02
Mrc1	-1,061	6,E-06	P4ha2	-1,157	3,E-03	Wnt2	-1,297	2,E-02
Nxpe5	-1,921	8,E-06	Soat1	-0,739	3,E-03	Plekhm1	-0,765	3,E-02
Serpib6a	-1,040	1,E-05	Acin1	-1,243	3,E-03	Snx11	-0,914	3,E-02
Agtrap	-0,829	2,E-05	Mmp27	-3,349	3,E-03	Mlph	-3,708	3,E-02
Fabp3	-2,687	2,E-05	Ndufs5	-5,325	3,E-03	Fam129b	-0,641	3,E-02
Clec4g	-7,781	2,E-05	Washc5	-0,687	3,E-03	Pld3	-0,829	3,E-02
Hgd	-7,536	3,E-05	Cndp2	-0,651	3,E-03	C2	-2,718	3,E-02
Ctsb	-0,661	3,E-05	Camk1	-0,513	4,E-03	Tspo	-0,587	3,E-02
Scn1b	-1,065	3,E-05	Pus1	-1,441	4,E-03	Snx24	-1,175	3,E-02
Gnpda1	-1,188	3,E-05	Anxa5	-0,857	4,E-03	Anxa6	-0,605	3,E-02
Hpgd	-2,014	3,E-05	Cstb	-1,249	4,E-03	Ralgps2	-6,235	3,E-02

Cd209b	-2,618	4,E-05	Rnaset2a	-0,737	4,E-03	Neo1	-2,439	3,E-02
Colec12	-1,781	5,E-05	Blvrb	-0,572	5,E-03	Vat1	-0,634	3,E-02
Emb	-4,095	9,E-05	Hnrnp1	-0,947	5,E-03	Fam213b	-0,939	3,E-02
Ifnar2	-0,704	1,E-04	Gyg	-0,984	6,E-03	Itga7	-6,301	3,E-02
Atp6v0e2	-6,963	1,E-04	Prickle1	-1,807	6,E-03	Tgfbi	-1,027	3,E-02
Sh3bgrl2	-3,381	1,E-04	Cxcl13	-1,459	6,E-03	Plod1	-0,644	4,E-02
Itm2b	-0,475	1,E-04	Rin2	-0,667	6,E-03	Hpn	-1,671	4,E-02
Prdx1	-0,641	1,E-04	Lamp1	-0,522	6,E-03	Ppm1f	-8,193	4,E-02
Galc	-1,117	1,E-04	Entpd1	-0,595	7,E-03	P2rx4	-0,569	4,E-02
Naglu	-0,832	1,E-04	Naga	-0,756	7,E-03	Por	-0,590	4,E-02
C1qa	-0,859	1,E-04	Bloc1s3	-7,156	7,E-03	lpo11	-1,113	4,E-02
Aldh2	-0,639	1,E-04	Amdhd2	-1,354	7,E-03	Pf4	-1,143	4,E-02
Abcd4	-1,332	1,E-04	C130026121Rik	-1,119	8,E-03	Tnks1bp1	-8,142	4,E-02
Gfra2	-4,129	1,E-04	Cdk8	-1,093	8,E-03	Wdr41	-0,591	4,E-02
Ctsa	-0,935	2,E-04	Cln5	-0,616	8,E-03	Selenow	-0,573	4,E-02
Prr13	-0,523	2,E-04	AW554918	-6,692	8,E-03	Mcu	-0,674	4,E-02
C1qc	-0,777	2,E-04	Prnp	-0,520	8,E-03	Col23a1	-1,474	4,E-02
Adk	-0,933	2,E-04	Ehbp1	-6,120	1,E-02	Tlr7	-0,916	4,E-02
Crtap	-1,012	2,E-04	Fam19a5	-6,341	1,E-02	Cln8	-0,622	5,E-02
Selenop	-1,348	2,E-04	Pnpla7	-0,805	1,E-02	Mdm1	-0,869	5,E-02
Cd68	-1,080	3,E-04	Blnk	-1,301	1,E-02	Car13	-1,776	5,E-02
Galnt9	-5,610	3,E-04	Tpp1	-0,556	1,E-02	Hip1	-1,810	5,E-02