



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE CIENCIAS  
AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

**“Identificación y caracterización de linfocitos B de memoria residentes en tejidos linfoides  
y no linfoides en modelo murino de lupus inducido”**

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

**Lilian Karina Poblete Azócar**

Director: Dra. Sarah Núñez Clausen

Patrocinante: Dra. María Rosa Bono

Agosto, 2023

Santiago - Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS  
AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

Informe de Aprobación de Seminario de Título

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por

**Lilian Karina Poblete Azócar**

**“Identificación y caracterización de linfocitos B de memoria residentes en tejidos linfoides y no linfoides en modelo murino de lupus inducido”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

**Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Dra. Sarah Núñez Clausen

Director Seminario de Título: \_\_\_\_\_

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente de la Comisión: \_\_\_\_\_

Evaluador: \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, 2023

A mis padres, Ruth Azócar y Juan Pablo Poblete,  
y a mi hermano Pablo, gracias por siempre confiar en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Sarah Núñez y a Justine Castañeda, por recibirme como tesista y en especial por la buena disposición que tuvieron de enseñarme, por sus correcciones y responder a mis dudas. Muchas gracias por incluirme en su grupo, y por permitirme aprender con ustedes. Agradezco a la Dra. María Rosa Bono y la Dra. Daniela Sauma, por recibirme en el laboratorio y por dictar el curso de inmunología, asignatura la cual generó mi motivación por el área y me llevó a solicitar hacer mi seminario de título en su laboratorio. También agradecer a quienes fueron mis compañeros de laboratorio, Paulina, Nicolás, Moira, Solange, Juan Pablo, Felipe, José, Eva, Pame y Vale. A Leo, por su preocupación y carisma.

Agradecer a mis padres y a mi hermano, que fueron mi mayor apoyo durante mi paso en la universidad. También a mis tíos y mis primos Gerson y Emma, por aceptarme en su hogar durante más de 5 años. A mi tata Daniel, por sus oraciones, y a mi tata Juan, que en vida siempre preguntaba por mí. A Kitty y Javi, gracias por su amistad. A Fundación Incide, por haberme apoyado y estar pendiente de mí. Gracias a todos los que de alguna manera me ayudaron en mi camino universitario.

Finalmente, gracias al financiamiento FONDECYT 11221128.

## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Respuesta adaptativa humoral y memoria inmunológica .....	5
1.2 Respuesta humoral en las enfermedades autoinmunes .....	6
1.3 Linfocitos de memoria residentes de tejidos.....	9
1.4 Linfocitos B de memoria residentes (BRM) en infecciones respiratorias .....	10
1.5 Linfocitos B de memoria residentes en las enfermedades autoinmunes.....	13
1.6 Modelos animales para el estudio del lupus eritematoso sistémico .....	14
2. HIPÓTESIS .....	15
3. OBJETIVOS.....	15
Objetivo General: .....	15
Objetivo Específicos .....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Materiales.....	16
4.1.1 Ratones .....	16
4.1.2 Anticuerpos para citometría de flujo .....	16
4.1.3 Generación del tetrámero DWEYS-biotin-SA APC .....	17
4.2 Métodos.....	17

4.2.1 ELISA.....	17
4.2.2 Marcaje intravenoso con anti-CD45-APC Cy7.....	18
4.2.3 Aislamiento celular de bazo, ganglios mediastinales, riñón y pulmón .....	18
4.2.4 Citometría de flujo.....	20
4.2.5 ELISpots.....	20
4.2.6 Estadística.....	21
5. RESULTADOS .....	22
5.1 El modelo murino de LES inducido por pristano (i.p) induce artritis y niveles elevados de autoanticuerpos contra dsDNA.....	22
5.2 El pulmón y los ganglios mediastinales en ratones del modelo murino de LES inducido por pristano presentan un mayor número de linfocitos B en contraste con los ratones sanos .....	24
5.3 El pulmón del modelo murino de LES inducido presentan un aumento en el número de linfocitos B de memoria en comparación al control .....	27
5.4 El pulmón de los ratones del modelo murino de LES posee un mayor porcentaje y número de linfocitos B de memoria no circulantes que el control.....	28
5.5 Los órganos de los ratones del modelo murino de LES inducido por pristano presentan una disminución en la frecuencia de expresión de IgA e IgG2b.....	32
5.6 La frecuencia de los linfocitos B de memoria no circulantes del pulmón de los ratones del modelo murino de LES inducido son principalmente CD73+.....	33
5.7 El pulmón de los ratones del modelo de LES posee una disminución en la frecuencia de los marcadores de residencia, pero un aumento en el número en comparación con el grupo control .....	36

5.8 El bazo y el pulmón en los ratones del modelo de LES presentan una tendencia al aumento de los linfocitos autorreactivos .....	39
6. DISCUSIÓN .....	43
7. CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS .....	51
MATERIAL COMPLEMENTARIO .....	64

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo de las moléculas de superficie asociadas al fenotipo de memoria en los linfocitos B de modelos murinos y los respectivos destinos de diferenciación.....	12
<b>Figura 2.</b> Los ratones BALB/c inyectados con pristano i.p. recapitulan los síntomas del LES en humanos como autoanticuerpos en suero contra dsDNA y artritis.....	23 - 24
<b>Figura 3.</b> El pulmón y los ganglios mediastinales tienen un alto número de linfocitos B en los ratones del modelo murino de LES en comparación al control.....	26
<b>Figura 4.</b> El pulmón de los ratones del modelo murino de LES inducido presenta un aumento en el número de linfocitos B de memoria.....	27 - 28
<b>Figura 5.</b> El pulmón de los ratones del modelo murino de LES contiene una alta frecuencia y número de linfocitos B no circulantes.....	29
<b>Figura 6.</b> Los linfocitos B de memoria $IgM^+$ en el pulmón de ratones del modelo murino de LES son principalmente no circulantes .....	30 - 31
<b>Figura 7.</b> Los linfocitos B de memoria $IgM^- IgD^-$ en el pulmón de los ratones del modelo murino de LES son principalmente no circulantes. ....	31
<b>Figura 8.</b> Los linfocitos B de memoria con cambio de clase en el pulmón del modelo murino de LES tienen una menor frecuencia de $IgA$ e $IgG2b$ en comparación con el control.....	32 - 33

<b>Figura 9.</b> Los linfocitos B de memoria IgM <sup>+</sup> no circulantes en el pulmón de los ratones enfermos presentan un aumento de CD73 <sup>+</sup> en comparación con el grupo control.....	34 - 35
<b>Figura 10.</b> Los linfocitos B de memoria IgM <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> no circulantes en el pulmón de los ratones enfermos presentan un aumento de CD73 <sup>+</sup> en comparación con el grupo control.....	35 - 36
<b>Figura 11.</b> El bazo y pulmón de ratones del modelo murino de LES tienen una disminución en la frecuencia de linfocitos B de memoria IgM <sup>-</sup> IgD <sup>-</sup> residentes.....	38 – 39
<b>Figura 12.</b> El bazo y pulmón de los ratones del modelo murino de LES presentan un menor porcentaje de linfocitos B autorreactivos que los ratones sanos.....	40 – 41
<b>Figura 13.</b> El bazo y pulmón de los ratones del modelo murino de LES presentan una tendencia a presentar células secretoras de IgG autorreactivos.....	42
<b>Figura suplementaria 1.</b> Aumento de la frecuencia de linfocitos B no circulantes totales en el pulmón de los ratones del modelo murino de LES.....	64
<b>Figura suplementaria 2.</b> El modelo de LES inducido por pristano presenta una mayor frecuencia de linfocitos B de memoria no circulantes en el pulmón.....	65 – 66
<b>Figura suplementaria 3.</b> Los linfocitos B de memoria no circulantes presentes en el pulmón y en los ganglios mediastinales de los ratones enfermos tienden a reingresar en la reacción de centro germinal.....	66 – 68

**Figura suplementaria 4.** El pulmón de los ratones del modelo murino de LES presenta una disminución de los marcadores típicos de residencia de los linfocitos T de memoria residentes en los linfocitos B de memoria IgM+. .....68 – 69

**Figura suplementaria 5.** El pulmón de los ratones del modelo murino de LES presenta una disminución de los marcadores típicos de residencia de los linfocitos T de memoria residentes en los linfocitos B de memoria con cambio de clase. ....69 – 70

**Figura suplementaria 6** En el modelo murino de LES hay una disminución de la frecuencia de IgA en todos los órganos. ....70 – 71

## RESUMEN

Un creciente número de estudios ha demostrado recientemente que los linfocitos B de memoria se pueden establecer en tejidos linfoides y no linfoides sin recircular, contribuyendo a una respuesta rápida y localizada en el órgano tras una infección. Estos linfocitos B de memoria residentes (BRM) se caracterizan por ser fenotípicamente distintos de sus contrapartes circulantes. Los BRM se han estudiado exclusivamente en el contexto de la respuesta inmune frente a infecciones, sin embargo, se desconoce si también pueden tener un rol relevante en las enfermedades autoinmunes. Algunos estudios sugieren que esta población también podría existir en las enfermedades autoinmunes, ya que se han identificado infiltrados de linfocitos B en biopsias de tejidos no linfoides como riñón y piel en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). En este trabajo, se propuso identificar y caracterizar linfocitos B de memoria residentes en un modelo de ratón de LES inducido por pristano. Para cumplir este objetivo, analizamos mediante citometría de flujo la frecuencia y el fenotipo de linfocitos B no circulantes en órganos linfoides y órganos no linfoides afectados en modelos de LES (riñón y pulmón). Para distinguir a los linfocitos no circulantes se realizó la técnica de tinción intravascular que permite distinguir los linfocitos en circulación y linfocitos que se encuentran en tejidos. Nuestros resultados muestran que el pulmón de los ratones enfermos contiene un mayor número de linfocitos B no circulantes que estarían infiltrando el tejido pulmonar. Además, los linfocitos B no circulantes que infiltran el pulmón contienen una proporción significativa de linfocitos B de memoria  $IgM^+$  y linfocitos B de memoria con cambio de isotipo. Por otra parte, al analizar el fenotipo de los linfocitos B de memoria no circulantes, en ratones enfermos encontramos un aumento en la expresión de CD73, asociada a la diferenciación funcional y la capacidad para dar origen a células plasmáticas y formación de centros germinales. Además, evaluamos si estos linfocitos B de memoria no circulantes expresan marcadores clásicos de linfocitos residentes de tejidos al analizar los marcadores CD69 y CXCR3 que están

relacionadas con la capacidad de migración y retención en los tejidos. Contrario a lo esperado, encontramos que los linfocitos B de memoria no circulantes en el pulmón de ratones enfermos en su mayoría carecen de la expresión de estos marcadores de residencia. Finalmente, para entender si la infiltración de linfocitos B en el pulmón podría tener un rol perjudicial en la enfermedad, se propuso evaluar la presencia de células autorreactivas en el bazo y pulmón de ratones enfermos. Mediante la técnica de ELISpot, se detectaron células con reactividad por dsDNA en el pulmón de ratones enfermos las cuales no se detectaron en el pulmón de ratones sanos. En conjunto, estos resultados demuestran que en el modelo de LES inducido por pristano existe una infiltración significativa de linfocitos B de memoria en el pulmón y estos presentan diferencias fenotípicas con respecto a ratones sanos, sin embargo, no recapitulan el fenotipo de los BRM que se ha descrito en el contexto de infecciones respiratorias.

## ABSTRACT

A growing number of studies have recently demonstrated that memory B cells can become established in lymphoid and non-lymphoid tissues without recirculation, contributing to a rapid and localized response in the organ following an infection. These resident memory B cells (BRM) are characterized by being phenotypically distinct from their circulating counterparts. BRMs have been exclusively studied in immune responses against infection, however, it remains unknown if they could also play a relevant role in autoimmune disease. Some studies suggest that this subset may also exist in autoimmune diseases, which show B cell infiltration in biopsies from non-lymphoid tissues such as kidney and skin in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). In this work, we sought to identify and characterize resident memory B cells in a pristane-induced mouse model of lupus. For this aim, we analyzed by flow cytometry the frequency and phenotype of non-circulating B cells in lymphoid organs and non-lymphoid organs that are affected in this model of lupus (kidneys and lung). To distinguish non-circulating lymphocytes, we performed intravascular labelling which allows the discrimination of lymphocytes that are in the circulation from lymphocytes that are present in the tissues. Our results show that the lung of diseased mice have an increased number of non-circulating B cells that are infiltrating the lung tissue. Non-circulating B cells that infiltrate the lung contain a large proportion of IgM<sup>+</sup> memory B cells and isotype-switched memory B cells. When we analyzed the phenotype of non-circulating memory B cells, we found an increase in the expression of CD73 in diseased mice, which is associated with the functional differentiation of memory B cells and their capacity to give rise to plasma cells and form germinal centers. Additionally, we evaluated is non-circulating B cell found in the lung express typical markers of tissue residency such as CD69 and CXCR3, which are related to the migration and retention in tissues. Unexpectedly, we found that non-circulating memory B cells in the lung of diseased mice mostly lack the expression of the tissue residency markers. Finally, in

order to understand if the increased B cell infiltration in the lung could have a detrimental effect in the disease, we sought to evaluate the presence of self-reactive B cells in the spleen and lung of diseased mice. Using ELISpot assays, we detected cells with reactivity against dsDNA in the lung of diseased mice, which were not detected in healthy mice. Altogether, these results show that in pristane-induced lupus there is a significant infiltration of memory B cells in the lung, which present phenotypical differences compared to non-circulating populations of healthy mice. However, lung-infiltrating memory B cells in this model do not recapitulate the phenotype of tissue residency that has been described in BRMs established during respiratory infections.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Respuesta adaptativa humoral y memoria inmunológica

El sistema inmune adaptativo está compuesto principalmente por dos poblaciones de células, llamados linfocitos B y linfocitos T que reconocen y establecen memoria contra un gran número de antígenos ya sea presentes en células del cuerpo que han sido infectadas por virus o que se han vuelto cancerosas como de aquellos provenientes de organismos patógenos extracelulares. Esta capacidad de “recordar” permite que, durante una reinfección, los linfocitos de memoria sean capaces de generar una respuesta rápida y eficaz para eliminar aquello que lo está reactivando. Un tipo de inmunidad adaptativa es la inmunidad humoral o también conocida como inmunidad mediada por anticuerpos. Esta consiste en la producción de anticuerpos por parte de linfocitos B activados que se han diferenciado a células plasmáticas que protegen al individuo de agentes patógenos, como virus y bacterias (Abbas y col., 2015). En una respuesta humoral primaria, los linfocitos B *naive*, que no se han activado en respuesta a un antígeno, circulan a través de los órganos linfoides y, una vez que se encuentran con un antígeno que los active, inician un proceso de diferenciación y proliferación (Batista & Harwood., 2009). A partir de su activación inicial, algunos linfocitos B se diferenciarán a células plasmáticas secretoras de anticuerpos de vida corta, mientras que otra proporción ingresará al centro germinal. El centro germinal es una estructura especializada del órgano linfoide donde los linfocitos B proliferan extensivamente y, mediante hipermutación somática, aumentan su afinidad por el antígeno. Además, realizan cambio de isotipo de inmunoglobulina de IgM a otros isotipos como IgG, IgA e IgE. Durante este proceso, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas de vida larga y linfocitos B de memoria. En el contexto de una reinfección, los linfocitos B de memoria se reactivan diferenciándose en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Abbas y col., 2015).

## **1.2 Respuesta humoral en las enfermedades autoinmunes**

Durante la maduración de los linfocitos B en la médula osea, estos pasan por un proceso de selección donde aquellos que reconocen antígenos propios con alta afinidad, reemplazan los receptores autorreactivos por no autorreactivos (proceso conocido como edición de receptores), o son eliminados antes de que circulen a través de los órganos linfoides secundarios (Wardemann & Nussenzweig., 2007). Esta capacidad de educar a los linfocitos para no reconocer lo propio se denomina tolerancia central. (Wardemann & Nussenzweig., 2007). En general, estos mecanismos centrales de puntos de control de tolerancia normalmente previenen la aparición de linfocitos B autorreactivos patógenos. Sin embargo, en las enfermedades autoinmunes, estos puntos de control se traspasan generando un aumento en el repertorio de linfocitos B contra autoantígenos los cuales pueden diferenciarse hacia células plasmáticas autorreactivas secretoras de autoanticuerpos y linfocitos B de memoria autorreactivos (Bonasia y col., 2021; Jacobi y col., 2009). Además, existen otros factores que contribuyen a una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes, como una mayor presencia de autoantígenos extracelulares. En particular, en la enfermedad del lupus eritematoso sistémico (LES), hay una disminución de la fagocitosis de las células que han realizado apoptosis lo que lleva a que el material nuclear no fagocitado pueda proporcionar señales de supervivencia para los linfocitos B autorreactivos y, en consecuencia, producir anticuerpos dirigidos contra las estructuras nucleares (Janko y col., 2008; Mahajan y col., 2016).

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune multisistémica que afecta a múltiples órganos, incluyendo la piel, las articulaciones, los riñones, el sistema respiratorio y el sistema nervioso central, entre otros. Su sintomatología puede variar desde una afectación cutánea leve hasta daño orgánico severo (Metry y col., 2019). Existen múltiples causas que pueden

desencadenar en el desarrollo de esta enfermedad, las principales se relacionan con componentes genéticos, alelos de riesgo, y una desregulación inmunológica que conlleva a alteraciones en el fenotipo y función de linfocitos T y de linfocitos B, y una producción anómala de citoquinas, quimioquinas y autoanticuerpos (Dörner & Furie., 2019).

Los tratamientos actuales constan principalmente de fármacos inmunosupresores y antiinflamatorios esteroides y no esteroides. Estos han permitido que la tasa de supervivencia de los pacientes con LES aumente considerablemente (Basta y col., 2020). Sin embargo, existen pacientes que son refractarios a estos tratamientos tradicionales donde solamente se presenta una mejora de corta duración. Además, existe un riesgo implicado en el uso prolongado de citotóxicos y corticosteroides, por lo que últimamente se han realizado esfuerzos para el desarrollo de nuevas terapias (Basta y col., 2020). Por otra parte, la pérdida de la tolerancia por parte de los linfocitos B es un evento clave en la patogenia del LES, dado que los autoanticuerpos producidos por los linfocitos B autorreactivos son un mecanismo central en la inducción de inflamación y daño en múltiples tejidos (Anolik., 2013). En base a esto, se han desarrollado terapias dirigidas a eliminar los linfocitos B, las cuales han demostrado ser prometedoras. Una de estas terapias consiste en la infusión intravenosa de un anticuerpo monoclonal contra CD20, una proteína que solo se expresa en linfocitos B, conocido como Rituximab (Looney y col., 2006). Sin embargo, esta terapia también presenta limitaciones en su eficacia debido a que algunos pacientes presentan una mejoría de corta duración. En estos casos, el agravamiento en la actividad de la enfermedad se asocia con un aumento de linfocitos B de memoria en la circulación; incluso, en algunos pacientes, la frecuencia de linfocitos B de memoria aumenta antes de una recaída (Leandro y col., 2006; Vital y col., 2011). La terapia con Rituximab se utiliza en otras enfermedades autoinmunes sistémicas como la artritis reumatoide, donde también se ha encontrado que el aumento de la población de linfocitos B de memoria en circulación permite predecir la reactivación de la enfermedad hasta

con 4 meses de anticipación (Trouvin y col., 2015).

Estos datos sugieren que existe una población de linfocitos B de memoria que no está siendo completamente eliminada y, por tanto, posiblemente contribuye a la repoblación del repertorio de linfocitos B que provocan las recaídas a pesar del tratamiento. Varios estudios sugieren que la terapia con Rituximab elimina eficazmente los linfocitos B en la circulación, sin embargo, linfocitos B localizados en tejidos serían resistentes a ser eliminados. Un estudio reportó que el tratamiento con anti-CD20 en el modelo murino de encefalitis autoinmune reduce los linfocitos B maduros en la sangre, bazo y órganos linfoides, sin embargo, una subpoblación de linfocitos B con un fenotipo activado permanece en los folículos esplénicos (Häusler y col., 2018). Otro estudio que analizó biopsias de ganglios linfáticos antes y después del tratamiento con Rituximab en pacientes con artritis reumatoide encontró que mientras los linfocitos B naive  $IgD^+$  se redujeron, los linfocitos B de memoria  $IgD^-CD27^+$  e  $IgD^-CD27^-$  no se eliminaron y se convirtieron en subconjuntos de linfocitos B predominantes en el ganglio linfático (Ramwadhoebe y col., 2019). En resumen, los linfocitos B tienen un papel central en la patogénesis autoinmune y son un blanco para las terapias de eliminación con anticuerpos. Sin embargo, a pesar de que la terapia logra una eliminación casi completa de los linfocitos B en la sangre, en pacientes que sufren recaídas se observa una expansión de linfocitos B de memoria. Por otro lado, a pesar de la terapia se logran detectar linfocitos B en órganos como los ganglios linfáticos. En conjunto, estos datos parecen indicar que las recaídas asociadas con el aumento de linfocitos B de memoria en sangre es producto de linfocitos B que se encuentran en tejidos y que están siendo resistentes a la terapia de eliminación. Esta característica de encontrarse en tejidos y no en circulación recuerda a una población de linfocitos B de memoria que ha sido caracterizada recientemente denominados como linfocitos B de memoria residentes de tejido, los cuales posiblemente serían los que están contribuyendo al retorno de la enfermedad.

### **1.3 Linfocitos de memoria residentes de tejidos**

Durante el transcurso de la investigación en inmunología se ha descubierto que los linfocitos son heterogéneos, expresan diversos marcadores, y hasta hace muy poco, se proponía que la memoria inmunológica se conservaba solamente en circulación por medio de los anticuerpos en suero y linfocitos B y T de memoria. Sin embargo, dado que los patógenos infectan los tejidos de barrera, entender la respuesta inmune local ha sido un objetivo de estudio que llevó al descubrimiento de una población de linfocitos T de memoria efectora que después de una infección viral o bacteriana permanecen en el tejido de barrera (Masopust y col., 2001; Masopust y col., 2010; Salusto y col., 1999; Szabo y col., 2019; Wakim y col., 2008). Estos estudios terminaron por confirmar un nuevo subconjunto de linfocitos T de memoria que se localizan en los tejidos denominados linfocitos T de memoria residentes de tejidos (TRM). Los TRM no circulan en los vasos sanguíneos debido principalmente a la inhibición o la falta de expresión de S1PR1 en su superficie, un receptor involucrado en la salida de los tejidos, incluidos los órganos linfoides secundarios, por medio del reconocimiento de la quimioquina de esfingosina-1-fosfato (Mackay y col., 2015; Masopust & Soerens., 2019).

A pesar del descubrimiento de los TRM, pocos estudios se han centrado en estudiar si sus contrapartes linfocitarias en la inmunidad adaptativa, los linfocitos B, comparten esta característica de adquirir residencia tisular. Esto puede deberse a la propia función de los linfocitos B puesto que, contrario a lo que sucede con los linfocitos T, donde es necesario que estén presentes en el tejido afectado, efectuando funciones citotóxicas y produciendo citoquinas, la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B se puede lograr sin la necesidad de migrar a un tejido específico. Sin embargo, existe cada vez más evidencia que sostiene su existencia tanto en órganos linfoides y no linfoides (Chen & Laidlaw., 2022).

#### 1.4 Linfocitos B de memoria residentes (BRM) en infecciones respiratorias

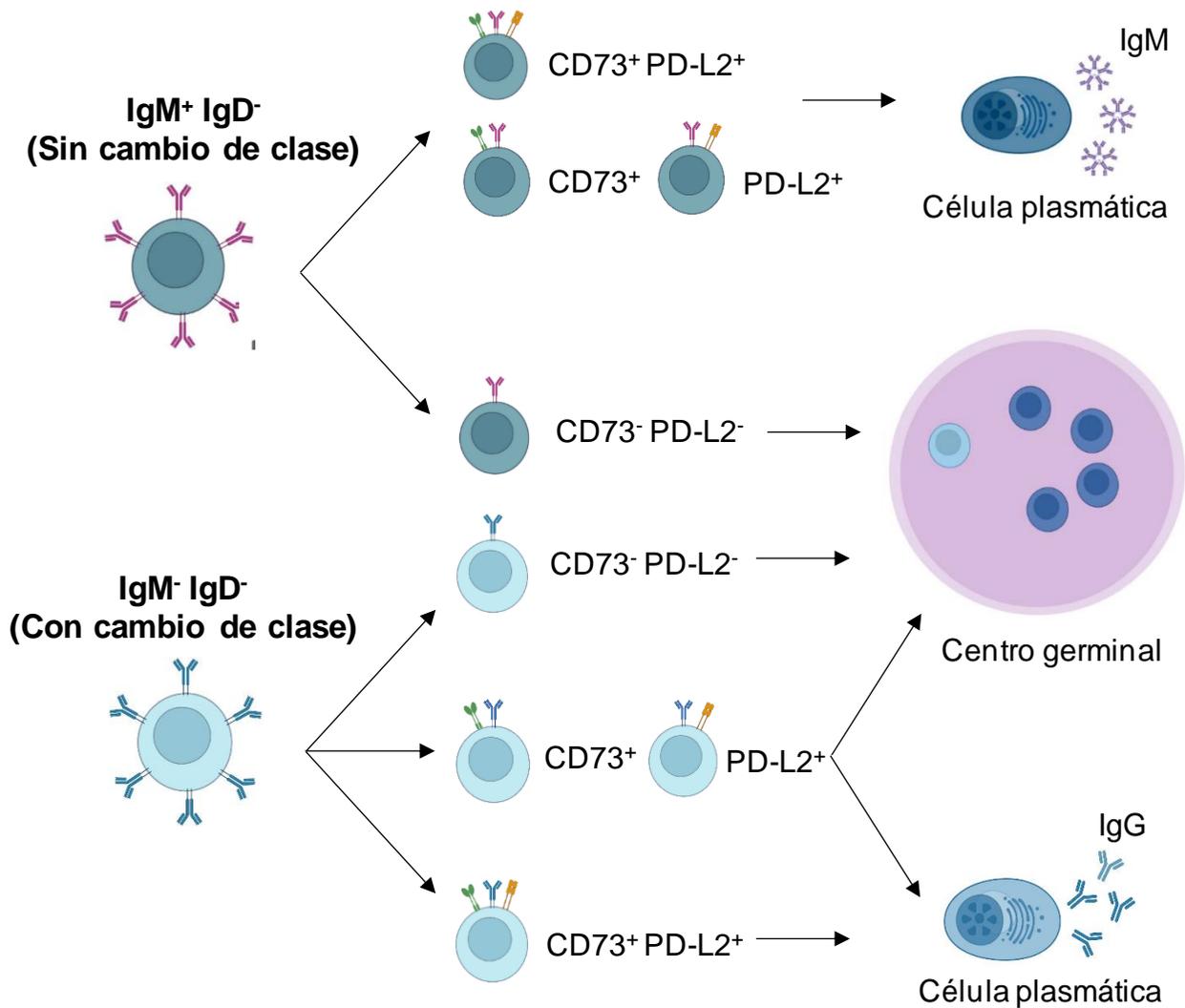
Los pocos estudios que abordan el establecimiento de linfocitos B de memoria residentes (BRM) se han centrado principalmente en el pulmón al ser un órgano que constantemente está expuesto a antígenos externos y ser un sitio de constantes infecciones. El uso de ratones como organismo modelo ha permitido el estudio de los linfocitos BRM y las células plasmáticas de pulmón generadas a partir de infecciones por influenza y *Streptococcus pneumoniae* (Allie y col., 2019; Barker y col., 2019; Barker y col., 2021; Gregoire y col., 2022; MacLean y col., 2022; Onodera y col., 2012; Tan y col., 2022). Los linfocitos B de memoria residentes del pulmón son fenotípicamente distintos a sus contrapartes en los órganos linfoides. En humanos y modelos murinos existen dos tipos de linfocitos B de memoria: linfocitos B de memoria  $IgM^+$  y linfocitos B de memoria con cambio de clase ( $IgM^- IgD^-$ ). En el pulmón los BRM son principalmente  $IgD^- IgM^-$  en contraste con los linfocitos B circulantes donde predominan los linfocitos B naive ( $IgM^+ IgD^+$ ). Posterior a una infección, existen diferencias en la expresión de CD73, CD80 y el ligando 2 de muerte celular programada PD-L2. Estructuralmente, CD73 es una enzima que cataliza la conversión de AMP a adenosina, CD80 y PD-L2 son moléculas co-estimuladoras o co-inhibitorias que pertenecen a la familia B7 que regulan las respuestas inmunitarias. En ratones, estos marcadores permiten definir distintos subtipos de linfocitos B de memoria, dado que estos se expresan de manera diferenciada de acuerdo con el estadio de diferenciación. Las células de memoria  $IgM^+$ , que tienen poca maduración de afinidad, por lo general, carecen de estos marcadores y al reactivarse, preferentemente forman centros germinales donde realizan cambio de clase y maduración de la afinidad (Dogan y col., 2009). En tanto, aquellas  $IgM^+$  que expresan CD73 y/o PD-L2 se diferencian rápidamente hacia células secretoras de anticuerpos. En el caso de los linfocitos B de memoria con cambio de clase ( $IgM^- IgD^-$ ), aquellos que expresan solo CD73 o PD-L2 mantienen su potencial de formar nuevos centros germinales y diferenciarse a células

plasmáticas, mientras que aquellos que co-expresan CD73, PD-L2 y CD80 tienden a dar origen exclusivamente a células plasmáticas (Figura 1) (Cancro & Tomayko 2021; Collins y col., 2005; Dhenni & Phan., 2020; Tomayko y col., 2010; Zuccarino-Catania y col., 2014). Esta heterogeneidad otorga una amplitud funcional a la respuesta humoral secundaria, dando lugar a una rápida producción de anticuerpos y a la vez, manteniendo el potencial de formar nuevas células de memoria y células plasmáticas de distinta especificidad. En una infección por influenza, los linfocitos B no circulantes del pulmón no expresan CD73, mientras que en los órganos linfoides si lo expresan; en cambio en una infección bacteriana por *Streptococcus pneumoniae* los linfocitos B de memoria no circulantes expresan de manera enriquecida estos marcadores, y predominantemente más de uno, por lo tanto la expresión es heterogénea, distinguiendo tanto subpoblaciones que expresan estas moléculas de manera individual o en conjunto (Allie y col., 2019; Barker y col., 2021).

Aunque aún no se ha confirmado del todo, los linfocitos no circulantes del pulmón comparten marcadores de residencia con los linfocitos T de memoria residentes; como la expresión de CXCR3 y CD69 y la ausencia de CD62L. CD69 es una glicoproteína de membrana que se expresa tempranamente después de la activación de los linfocitos T y otras células hematopoyéticas en sitios de inflamación crónica (Dorfman & Shamsafaei; 2002; Sancho y col., 2005), CXCR3 es un receptor de quimioquinas involucrado en la formación de TRM dado que sus ligandos corresponden a citoquinas que están relacionadas al reclutamiento de subconjuntos de linfocitos T en sitios de inflamación (Billottet y col., 2013). CD62L, también llamada L-selectina, es necesaria para la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular y la migración de los linfocitos a los ganglios linfáticos periféricos en presencia de inflamación (Gaddi y col., 2001). Los TRM y BRM comparten una alta expresión de CD69 y CXCR3, y una baja o nula expresión de CD62L (Allie y col., 2019; Barker y col., 2021; Onodera y col., 2012). Los BRM que han hecho cambio

de clase también muestran una expresión diferencial en la expresión de inmunoglobulina IgA en el contexto de una infección por influenza, los cuales se reactivan rápidamente durante un desafío secundario. El cambio de linfocitos de memoria IgA aumenta en el parénquima pulmonar después de una infección, pero en cuanto a frecuencia representa una pequeña fracción de la población de la población de memoria (Oh y col., 2021; Onodera y col., 2012; Tan y col., 2022).

### Linfocitos B de memoria    Subtipos de linfocitos B de memoria



**Figura 1. Esquema representativo de las moléculas de superficie asociadas al fenotipo de memoria en los linfocitos B de modelos murinos y los respectivos destinos de diferenciación.** En modelos murinos existen linfocitos B de memoria que han realizado cambio de clase (IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) como sin cambio de clase (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>). Además, dependiendo de la expresión de las moléculas complementarias como CD73 y PD-L2 una vez los linfocitos B de memoria son desafiados pueden reingresar al centro germinal o diferenciarse hacia células plasmáticas.

## **1.5 Linfocitos B de memoria residentes en las enfermedades autoinmunes**

Si bien no se ha determinado formalmente la existencia de BRM residentes en el contexto de las enfermedades autoinmunes, si se han realizado algunas observaciones que apuntan la existencia de esta subpoblación. En pacientes con esclerodermia, una enfermedad reumática autoinmunitaria del tejido conectivo, el 61% de los pacientes contienen linfocitos B CD20<sup>+</sup> en la piel, los cuales no se observan en muestras de sujetos sanos. Además, el hallazgo de linfocitos B en la piel puede estar involucrado en el inicio y expansión de la inflamación (Bosello y col., 2018). En biopsias renales de pacientes con nefritis lúpica se han encontrado cúmulos de linfocitos B y una mayor expresión de BCA-1, una quimioquina cuya función es atraer a los linfocitos B, mientras que casi no hay células B presentes en riñones sanos. Además, hay una correlación entre el grado de infiltración de estas células con la manifestación clínica de la enfermedad (Steinmetz y col., 2008). Los linfocitos B también provocan daño tisular a través de la secreción de citoquinas proinflamatorias en algunos casos de rechazo en el trasplante renal (Tse y col., 2015). Por lo tanto, resulta importante dilucidar si los linfocitos B adquieren residencia tisular en el contexto de las enfermedades autoinmunes debido a su posible implicancia en el retorno de la enfermedad o recaídas, dado que son refractarias al tratamiento de terapias de eliminación de linfocitos B en sangre. Comprender el papel de los BRM permitiría la discusión sobre los blancos utilizados en los tratamientos actuales y así mejorar la calidad de vida de aquellos pacientes donde la terapia solo brinda una remisión temporal. En este trabajo, nos centramos en determinar y caracterizar los linfocitos B de memoria no circulantes que adquieren residencia tisular en el riñón, pulmón y órganos linfoides, además de evaluar la infiltración de linfocitos B autorreactivos.

## **1.6 Modelos animales para el estudio del lupus eritematoso sistémico**

Para estudiar el lupus eritematoso sistémico se han generado varios modelos como NZB/W F1 generado por el híbrido F1 entre las cepas NZB y NZW, y la cepa de linfoproliferación MRL/lpr (Gulinello & Putterman., 2011; Monneaux y col., 2001; Perry y col., 2011). Se ha validado un modelo murino de lupus eritematoso sistémico el cual es inducido mediante la exposición a un desencadenante, como por ejemplo el pristano (2, 6, 10 y 14 tetrametilpentadecano, TMPD), que es un alcaloide isoprenoide que se encuentra enriquecido en el aceite mineral. Las inyecciones intraperitoneales de esta sustancia en los ratones BALB/c genera diversos síntomas que son característicos de la enfermedad, como la inducción de autoanticuerpos contra anti-Sm, anti-DNA y anti-histona y depósitos de complejos inmunitarios en el riñón que provoca nefritis grave y proteinuria. Además, se han identificado artritis y capilaritis pulmonar hemorrágica al igual que en los pacientes con LES (Freitas y col., 2017; Perry y col., 2011; Satoh & Reeves.,1994; Satoh y col.,1995; Wooley y col., 1989).

En este trabajo evaluamos y caracterizamos los linfocitos B de memoria no circulantes en distintos órganos de interés en el contexto de la enfermedad autoinmune del lupus eritematoso sistémico, en el cual consideramos el pulmón como un objetivo a evaluar, tanto por los diversos estudios que han caracterizado los linfocitos BRM en este órgano en el contexto de enfermedades respiratorias, como por ser uno de los órganos que se ve afectado en el modelo murino de LES inducido por pristano al inducir capilaritis pulmonar asociado a la enfermedad, el cual es el modelo utilizado en este trabajo. Además, en el lupus eritematoso sistémico en humanos la hemorragia alveolar difusa es una de las complicaciones más graves (Al-Adhoubi & Bystrom 2020; Chowdhary y col., 2007).

## **2. HIPÓTESIS**

Un modelo murino de LES inducido por pristano genera linfocitos B de memoria residentes autorreactivos en el riñón y pulmón.

## **3. OBJETIVOS**

**Objetivo General:** Demostrar la presencia de linfocitos B de memoria residentes autorreactivos en tejidos en el riñón y pulmón en un modelo de ratón de LES inducido por pristano.

### **Objetivo Específicos:**

1. Identificar y analizar marcadores de superficie asociados a células de memoria residentes en los linfocitos B no circulantes en el riñón y pulmón de modelo murino de LES inducido por pristano.
2. Evaluar si los linfocitos B de memoria residentes en el riñón y pulmón presentan autorreactividad contra ds-DNA

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Ratones**

Ratones hembra de la cepa BALB/c fueron utilizados en todos los experimentos, tanto para la caracterización del fenotipo de residencia de los linfocitos B de memoria como para la detección de linfocitos B autorreactivos. Estos fueron obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) y se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida (Santiago, Chile). El día 0 los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con 500  $\mu$ L de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano; Sigma-Aldrich) para la inducción de síntomas de LES o con 500  $\mu$ L de PBS como grupo control. Se les realizó un monitoreo mensual para evaluar el avance de la enfermedad mediante medición de proteinuria con tiras reactivas (Siemens) que determinan la concentración de la proteína en la orina entre 0, +1 (30mg/dL), +2 (100mg/dL), +3 (300mg/dL) y +4 (>2000mg/dL). También se les evaluó peso y artritis, este último mediante el sistema de puntuación de artritis en ratones Chondrex, siendo 0) aspecto normal, 1) una articulación presenta enrojecimiento e hinchazón, 2) dos tipos de articulaciones presentan enrojecimiento e hinchazón, 3) tres tipos de articulaciones tienen enrojecimiento e hinchazón y 4) donde toda la pata presenta enrojecimiento e hinchazón y hay pérdida de la definición anatómica. Además, se obtuvo suero con el fin de detectar anticuerpos específicos contra dsDNA mediante un ensayo ELISA.

#### **4.1.2 Anticuerpos para citometría de flujo**

Para la identificación y caracterización del fenotipo de los linfocitos B se usaron los siguientes anticuerpos y sus respectivos fluorocromos: GL7-FITC (clon GL7, BioLegend), PD-L2-PE (clon

TY25, BioLegend), IgM-PE Cy7 (clon RMM-1, BioLegend), CD73-APC (clon TY/11.8, BioLegend), B220-BV510 (clon RA3-6B2, BioLegend), IgD-BV650 (clon 11-2bc.2a, BioLegend), CD19-BV711 (clon 6D5, BioLegend), CD69-PE (clon H1.2F3, BioLegend), GL-7-APC (clon GL-7, BioLegend), CXCR3-BV421 (clon CXCR3-173, BioLegend), IgG2b-FITC (clon RMG2b-1, BioLegend), IgA-PE (clon mA-6E1, Invitrogen), e IgM-BV605 (clon RMM-1, BioLegend)

#### **4.1.3 Generación del tetrámero DWEYS-biotin-SA APC**

Para la detección de los linfocitos B autorreactivos mediante citometría de flujo, se adquirió el péptido DWEYS biotinilado (Genscript), el cual actúa como un mimetopo de dsDNA. El péptido se incubó con estreptavidina conjugada con el fluorocromo APC (Biolegend) a una concentración molar 10:1 a 4°C durante toda la noche. Antes de su uso se filtraron por columnas de purificación por exclusión de tamaño molecular siguiendo las instrucciones del proveedor (Zeba Spin 40K MWCO, Thermofisher).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 ELISA**

Los autoanticuerpos específicos contra dsDNA en suero se midieron mediante ensayo ELISA. Se utilizaron placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (Thermofisher) que se recubrieron con 65ng/pozo de ADN de timo de cabra (Sigma-Aldrich), disuelto en tampón SSC (NaCl 0,15M + citrato de sodio 0,015M pH 8, disuelto en agua) por 18 horas a 37°C. Se lavó el exceso de antígeno con PBS-Tween 0,05% y se bloqueó la placa incubando con PBS-Tween 0,05% por 1 hora. Luego se añadieron los sueros a una dilución de 1/250 en PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora.

Luego de lavar 3 veces con PBS-Tween 0,05% se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-mouse IgG-HRP; Biolegend) a una dilución 1/4000 y se incubó por 1 hora. Finalmente, luego de lavar 3 veces la placa con PBS-Tween 0,05% se añadieron 100µL del sustrato TMB (BD Biosciences). Una vez transcurrida la reacción enzimática, esta se detuvo con 50µL de una solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M. En todos los ensayos se utilizó como control positivo suero de ratón lúpico hembra NZB/NZWF1 de aproximadamente 8 meses de edad, mientras que como control negativo se usó suero de ratón BALB/c de aproximadamente 8 meses de edad.

#### **4.2.2 Marcaje intravenoso con anti-CD45-APC Cy7**

Una vez los ratones desarrollaron síntomas avanzados de la enfermedad, aproximadamente a los 6 meses desde la inyección con pristano o PBS, se analizaron los linfocitos B de memoria residentes autorreactivos en tejidos linfoides (bazo y ganglios mediastinales) y no linfoides (riñón y pulmón). Para discernir entre las células en circulación versus las células residentes de tejidos se inyectó por vía intravenosa (iv) 3µg del anticuerpo anti-CD45, que reconoce todos los leucocitos, conjugado con el fluorocromo APC Cy7 (clon 30-F11, Biolegend) 3 minutos previo a la eutanasia. En base a que el anticuerpo fue inyectado vía intravenosa, los leucocitos que estaban en el parénquima tisular no se marcaron con el anticuerpo, permitiendo separar entre las células circulantes (CD45iv<sup>+</sup>) y no circulantes (CD45iv<sup>-</sup>) mediante análisis en citometría de flujo. Los ratones fueron sacrificados mediante exposición a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) siguiendo con las normativas éticas de la Universidad de Chile.

#### **4.2.3 Aislamiento celular de bazo, ganglios mediastinales, riñón y pulmón**

Se extrajeron bazo, ganglios mediastinales, riñones y pulmones para la obtención de células. El bazo se perfundió con 10 mL de medio RPMI+10% FCS. La suspensión celular resultante se

centrifugó a 600 g x 7 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos RBC (RBC Lysis Buffer, Biolegend) durante 5 minutos en hielo. Las células se lavaron con medio y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Las células se suspendieron en 5 mL de RPMI+10% FCS.

Los ganglios mediastinales se procesaron mediante disgregación mecánica en 500 µL de medio y la suspensión celular resultante se filtró por malla metálica de 90µm. La suspensión de células se completó con medio RPMI+10% FCS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. El pellet de las células obtenidas de los ratones control se suspendieron en 1 mL de medio y el de los ratones del modelo murino de LES inducido en 3 mL de RPMI+10% FCS.

Para el procesamiento de los órganos no linfoides se preparó medio de digestión, el cual por cada 5 mL de RPMI+10% FCS se agregó 20 µL Colagenasa D 100ug/ml y 10 µL DNAsa I 10mg/ml. Tanto el pulmón como el riñón se disgregaron con tijeras quirúrgicas en 500 µL de medio digestión. La suspensión de células de estos órganos se traspasó a tubos gentleMACS™ C, se agregó medio de digestión hasta completar los 5 mL y se incubó durante 40 min a 37°C. Pasado ese tiempo, las muestras se disociaron en MACS Dissociator (Miltenyi) al ejecutar sucesivamente los programas m\_spleen\_02\_02 y m\_lung\_02.01. El contenido total fue pasado por CellStrainer de 40 µm a tubos de 50 mL. Para el riñón, se descartó el sobrenadante y se añadió 8 mL de Percoll 37% por cada par a temperatura ambiente (2,96 mL Percoll, 0,8 mL PBS 10X y 4,24 mL de agua bidestilada). Se traspasó a un tubo de 15 mL y se centrifugó a 500 x g durante 15 min, a freno 0 y temperatura ambiente.

Para el riñón y pulmón, se descartó el sobrenadante y se lisaron los glóbulos rojos con 2 mL de buffer de lisis RBC durante 5 minutos en hielo; se completó con RPMI + 10% FCS para lavar las

células y se centrifugó a 600 x g por 7 minutos a 4° C. Se resuspendieron en un volumen final de 3 mL de medio RPMI+10% FCS.

Las células se contaron en una cámara de Neubauer al tomar una alícuota de cada suspensión celular y teñirlas con azul tripán para evaluar la viabilidad celular.

#### **4.2.4 Citometría de flujo**

Para la caracterización del fenotipo de las poblaciones de linfocitos B de memoria residentes se utilizó citometría de flujo. Para esto, de las células totales obtenidas, se extrajeron las siguientes cantidades por órgano: 3 x 10<sup>6</sup> células de bazo, 2 x 10<sup>6</sup> células de ganglios mediastinales, 2 x 10<sup>6</sup> células de los pulmones y 2 x 10<sup>6</sup> células del riñón. Las células se lavaron con PBS + 2 % FCS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Con el fin de bloquear la unión inespecífica de anticuerpos por receptores Fc, el pellet se incubó con Fc Block (clon 93, BioLegend), un anticuerpo contra CD16/32, durante 15 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo, se incubaron las células con los anticuerpos fluorescentes para la detección de las moléculas de superficie para la caracterización de los linfocitos B residentes y sus subpoblaciones. Además, junto con los anticuerpos fluorescentes se incubó con DWEYS-biotin-SA-APC para la detección de los linfocitos B autorreactivos. Finalmente, las células se lavaron con 900 µL de PBS + 2% FCS, se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos, y se resuspendieron en 300 µL de PBS + 2% FCS. Para descartar las células muertas se añadió a cada muestra 0,5 µL yoduro de propidio (PI). Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACSAria III (BD Biosciences) y los datos de citometría resultantes se analizaron en el programa FlowJo v10.8 (Tree Star, Inc).

#### **4.2.5 ELISpots**

Para la cuantificación de células productoras de anticuerpos IgG y autoanticuerpos IgG anti-

dsDNA se utilizó la técnica de ELISpot. Se utilizaron placas de 96 pocillos MAIPS4510 (Millipore), las cuales fueron pre-tratadas con 15µL de etanol 70%. Las placas fueron incubadas con 15µg/ml de un anticuerpo de captura anti-IgG (Biolegend) o 10µg/ml de ADN de timo de cabra (Sigma-Aldrich) por 18 horas a 4°C. Los pozos incubados con DNA fueron pre-incubados con polilisina-L (Sigma-Aldrich) por una hora a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con medio RPMI + 10% FCS para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos. Se añadieron distintas cantidades de células de cada órgano: Para bazo se sembraron pocillos con 25.000 y 400.000 células, para el pulmón 25.000 y 400.000 células y para los ganglios mediastinales 10.000 y 200.000 células. Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Luego de la incubación, para la detección de células secretoras de anticuerpos, las placas se lavaron 5 veces con PBS y se añadió 0,5µg/ml de anticuerpo anti-IgG biotinilado y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar las placas con PBS, se añadió avidina-HRP (eBioscience) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se incubaron con el sustrato AEC (3-amino-9-etilcarbazol) por 30 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con abundante agua destilada y se dejaron secar toda la noche a 4°C. El número de *spots* por pozo fue determinado usando el lector de ELISpot AELVIS y el software Eli.Analyse ELISpot Analysis Software V6.0.

#### **4.2.6 Estadística**

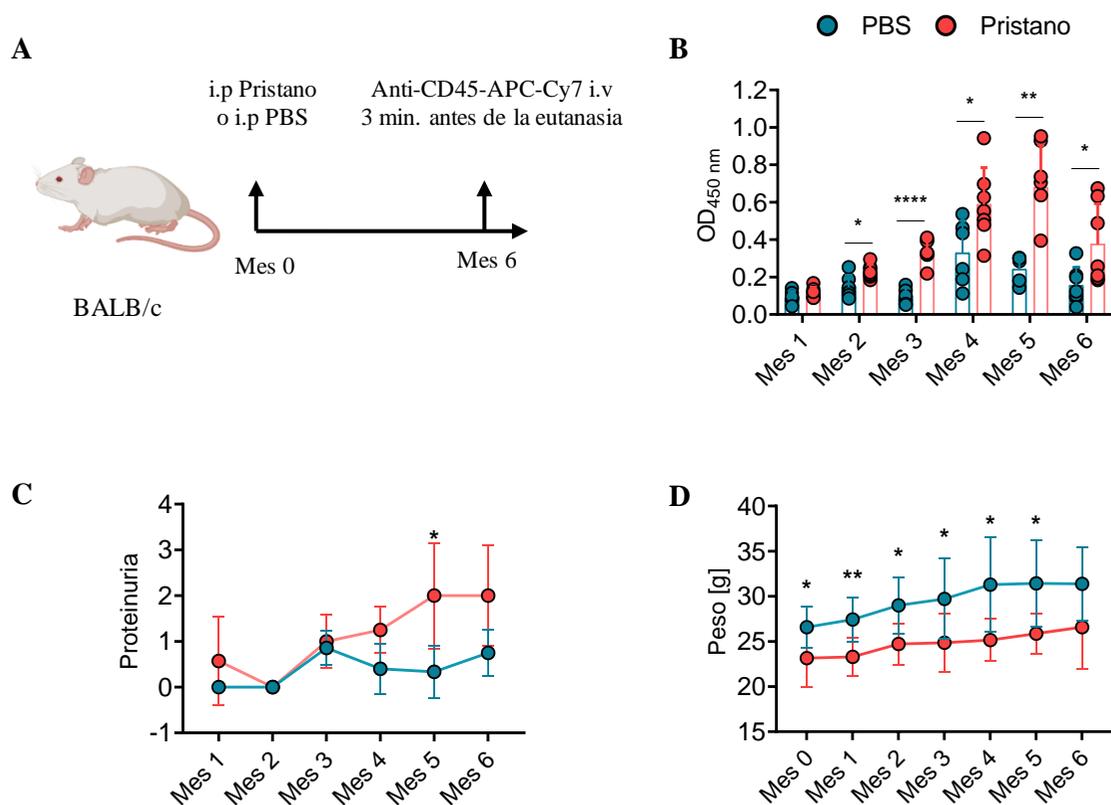
Los datos se analizaron y graficaron en Graphpad Prism 8.0.1. Estos se sometieron a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. De acuerdo con el resultado de la prueba de normalidad, para el análisis entre dos variables se sometieron a prueba-t de Student de dos colas no pareado (prueba paramétrica) o la prueba Mann-Whitney (no paramétrico). Los valores exactos de probabilidad  $p < 0,05$  significativos se muestran en las respectivas figuras.

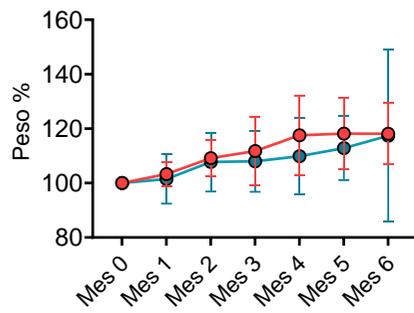
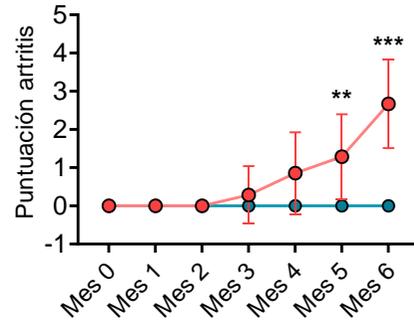
## **5. RESULTADOS**

### **5.1 El modelo murino de LES inducido por pristano (i.p) induce artritis y niveles elevados de autoanticuerpos contra dsDNA.**

Estudios recientes han demostrado el establecimiento de linfocitos B de memoria residentes en el contexto de enfermedades de origen viral como la influenza o bacteriano como la neumonía (Allie y col., 2019; Barker y col., 2021). Sin embargo, no se ha abordado en profundidad su existencia en el contexto de las enfermedades autoinmunes. Nuestro primer objetivo fue evaluar la presencia y el fenotipo de los linfocitos B de memoria no circulantes de órganos linfoides y no linfoides de ratones BALB/c con LES inducido por pristano y poder determinar dentro de esta población el establecimiento de linfocitos B de memoria residentes en base a marcadores típicos de residencia de los linfocitos T residentes. El pristano es un alcano isoprenoide que al ser inyectado vía intraperitoneal induce autoanticuerpos anti-dsDNA y, después de 6 meses desde la administración, los ratones desarrollan nefritis grave como consecuencia de depósitos de inmunocomplejos en el riñón; también desarrollan capilaritis pulmonar e infiltración pulmonar de células inmunitarias, los que son síntomas que se presentan en la enfermedad del LES en humanos (Perry y col., 2011). Para validar la inducción de una enfermedad similar al LES humano en el modelo murino, se evaluaron mensualmente los siguientes parámetros: niveles de autoanticuerpos anti-dsDNA en suero, peso, artritis y proteinuria. Los ratones enfermos presentaron un aumento significativo en los niveles de autoanticuerpos contra dsDNA con respecto al grupo control a partir del segundo mes, siendo el quinto mes donde se detectaron los mayores niveles de autoanticuerpos en los ratones del modelo murino de LES (Figura 2 B). Contrario a lo esperado, estos ratones no alcanzaron niveles elevados de proteinuria en la orina, que son característicos de un daño renal. Solo se encontró una diferencia levemente significativa en el quinto mes en comparación con el

grupo control, en donde los ratones enfermos alcanzaron niveles de proteinuria en la orina de un máximo de ~30 mg/dl, en comparación a los niveles de proteinuria de los ratones control, los cuales no obtuvieron valores mayores a trazas por lo que, en nuestro caso, en este modelo la inducción de LES por pristano, no desarrolló síntomas de nefritis grave asociada a la enfermedad (Figura 2 C). Además, fue posible observar que en cada mes los ratones con LES presentaron un menor peso que los ratones control, sin embargo, al analizar porcentaje de peso de cada mes en relación con el mes 0 (100%), se pudo observar que ambos grupos presentaron aumentos de peso sin diferencias significativas entre sí (Figura 2 D, E). La artritis fue evaluada mediante un sistema de puntuación Chondrex con escala de 1 al 4 (detallada en Materiales y métodos). Encontramos que los ratones con LES presentaron diversos grados de artritis, siendo la puntuación de 3 la más alta detectada en uno de los ratones al quinto mes (Figura 2 F). Por lo tanto, nuestro modelo recapituló los síntomas del LES en humanos a excepción de la nefritis grave, en donde solo se observaron aumentos moderados de los niveles de proteinuria.



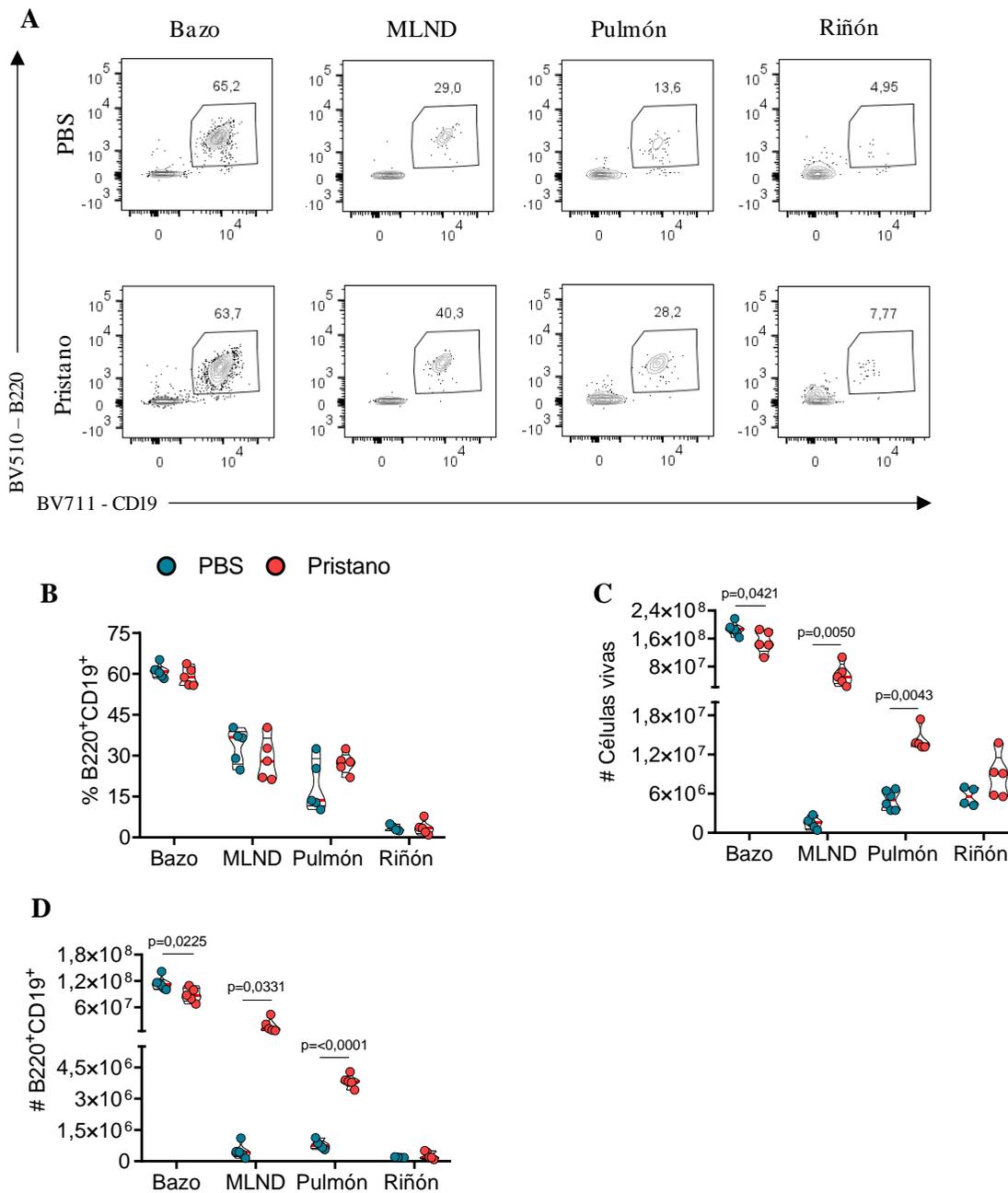
**E****F**

**Figura 2. Los ratones BALB/c inyectados con pristano i.p. recapitulan los síntomas del LES en humanos como autoanticuerpos en suero contra dsDNA y artritis.** (A) Esquema del procedimiento para inducir síntomas de LES en ratones BALB/c mediante inyección con pristano o vía intraperitoneal. (B) Gráfico de medición de autoanticuerpos anti-dsDNA normalizados ( $OD_{450\text{ nm}}$ ) en el tiempo (meses) desde la inyección intraperitoneal en los ratones del modelo murino de LES (pristano) y el grupo control (PBS); para la condición PBS: mes 1 (n=7), mes 2 (n=6), mes 3 (n=7), mes 4 (n=6), mes 5 (n=5) y mes 6 (n=7); condición LES todos los meses tienen n=7; Los valores de p son los siguientes: mes 2, \* P = 0,0132; mes 3, \*\*\*\* P = <0,0001; mes 4, \* P = 0,0293; mes 5, \*\* P = 0,0021; mes 6, \* P = 0,0294 (C) Gráfico de proteinuria en la orina, siendo 0 negativo, 1=trazas, 2=30 mg/dl, 3=100 mg/dl y 4=  $\geq 500$  mg/dl. El valor de p es el siguiente: mes 5 \* P = 0,0489; para la condición PBS: mes 1 (n=7), mes 2 (n=7), mes 3 (n=7), mes 4 (n=5), mes 5 (n=3) y mes 6 (n=4); condición LES para mes 1, mes 2, mes 3, mes 5 n=7, para mes 4 y mes 6 n=4 (D) Gráfico del porcentaje de peso de los ratones del modelo murino de LES y control para cada mes en relación con el mes 0. Los valores de p son los siguientes: Mes 0, \* P = 0,0413; Mes 1, \*\* P = 0,0055; Mes 2, \* P = 0,0124; Mes 3, \* P = 0,0380; Mes 4, \* P = 0,0153; Mes 5, \* P = 0,0156; tanto para cada mes como para cada condición el n=7 (E) Gráfico del porcentaje de cambio de peso promedio de cada mes en relación con el mes 0 (F) Gráfico de la puntuación de artritis desde la inyección i.p. (n=3). Los valores de p son los siguientes: Mes 5, \*\* P = 0,0100; Mes 6, \*\*\* P = 0,0002. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores de probabilidad (p) significativos.  $OD_{450\text{ nm}}$ , densidad óptica.

## 5.2 El pulmón y los ganglios mediastinales en ratones del modelo murino de LES inducido por pristano presentan un mayor número de linfocitos B en contraste con los ratones sanos

Una vez establecido el desarrollo de la enfermedad, evaluada mediante los parámetros mencionados anteriormente, nuestro primer objetivo consistió en evaluar mediante citometría de flujo cambios en el porcentaje y número de linfocitos B totales ( $CD19^+B220^+$ ) en órganos linfoides (bazo y ganglios mediastinales) y órganos no linfoides afectados (pulmón y riñón) en ratones enfermos. Observamos que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos B al

comparar ambas condiciones en ninguno de los órganos. Como se muestra en la Figura 3, en el bazo hay una alta proporción (~60%) de linfocitos B con porcentajes similares en ratones sanos y enfermos. Además, observamos que el pulmón sano hay un porcentaje significativo de linfocitos B (~18%) y se observa una tendencia al aumento de los linfocitos B en el pulmón de los ratones con LES inducido (~27,3 %) en comparación con el control. El riñón es el órgano donde se observó la menor proporción de linfocitos B tanto en ratones sanos y enfermos (Figura 3 A, B). Por otra parte, se observó que en el pulmón y los ganglios mediastinales hubo un aumento en el número de células vivas totales en los ratones con LES en comparación con sus respectivos controles, el bazo presentó una leve disminución del número de células vivas en los ratones del modelo murino de LES, mientras que en el riñón no se presentaron diferencias significativas (Figura 3 C). Esta tendencia se vio reflejada en el número de linfocitos B totales, en donde el bazo presentó un menor número de linfocitos B en los ratones con LES inducido por pristano que en el control. Los ganglios mediastinales presentaron un aumento importante del número de linfocitos B en la condición LES, probablemente relacionado al aumento de tamaño del órgano observado al momento de la disección y el número total de células. Interesantemente, en el pulmón de los ratones con LES inducido se observó un aumento significativo, con un promedio de linfocitos B aproximado de  $3,8 \times 10^6$  en los ratones con LES comparado con un aproximado de  $8,0 \times 10^5$  de linfocitos B en los ratones sanos. El riñón, por otro lado, contiene un escaso número de linfocitos B y no se encontraron diferencias significativas entre animales sanos y con LES (Figura 3 C). De acuerdo con estos primeros resultados obtenidos, donde en el riñón la frecuencia y cantidad de linfocitos B no se vieron afectados por la inducción de LES, y que el enfoque de este seminario es estudiar a los linfocitos B residentes de tejidos no linfoides, los resultados presentados de aquí en adelante se centran en los linfocitos B de pulmón, utilizando el bazo como comparación.

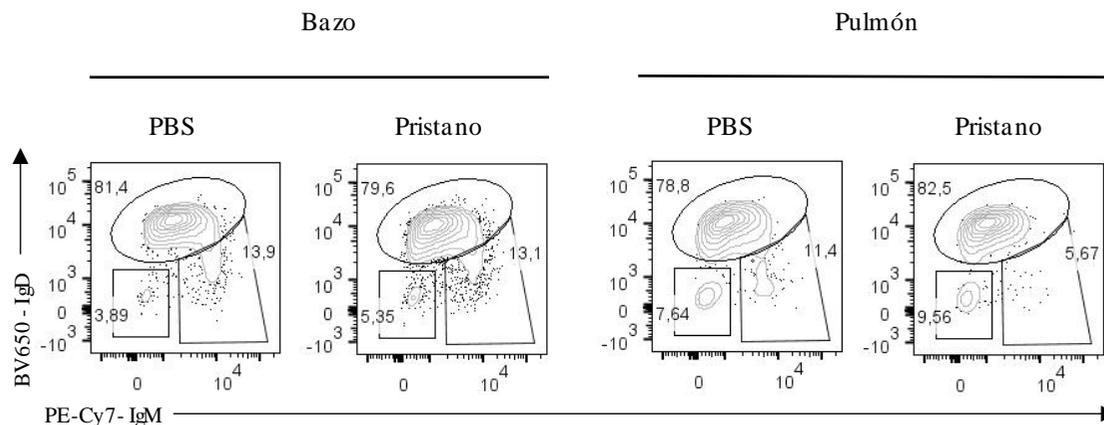


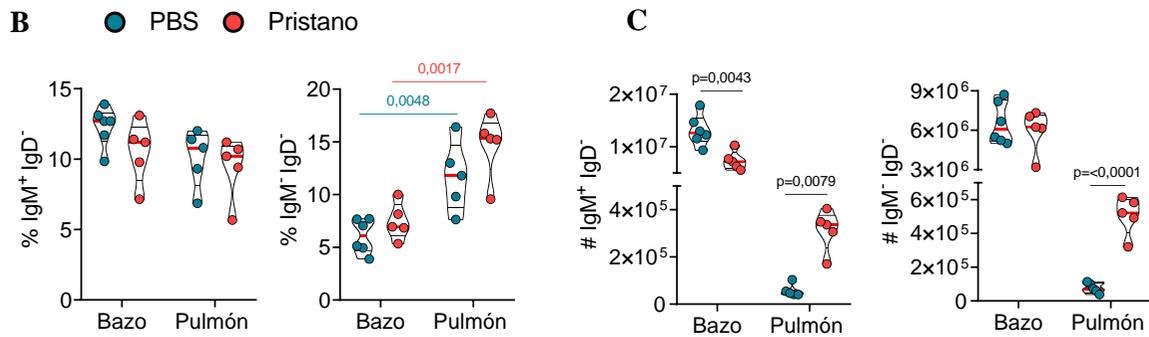
**Figura 3. El pulmón y los ganglios mediastinales tienen un alto número de linfocitos B en los ratones del modelo murino de LES en comparación al control.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos B en las condiciones LES y control de los siguientes órganos: bazo, MLND, pulmón y riñón (C) Gráfico de número de células vivas totales por órgano (D) Gráfico de número de linfocitos B en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia; #, número.

### 5.3 El pulmón del modelo murino de LES inducido presentan un aumento en el número de linfocitos B de memoria en comparación al control

Nuestros resultados muestran que en el modelo de LES estudiado se evidencia un mayor número de linfocitos B en el pulmón. A continuación, nos propusimos determinar si este aumento está asociado a un mayor número de linfocitos B de memoria. Para ello, evaluamos la expresión de las inmunoglobulinas IgD e IgM dado que estos marcadores permiten distinguir a los linfocitos B *naive* (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>) y linfocitos B de memoria, ya sea aquellos que han realizado cambio de clase (IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>), como los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> (IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) (Cancro & Tomayko., 2021). Al evaluar la frecuencia de los linfocitos B de memoria tanto IgM<sup>+</sup> como IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> no se observaron diferencias significativas entre el control y LES inducido por pristano en ninguno de los órganos. Sin embargo, si fue posible apreciar una tendencia de que tanto en el bazo como en el pulmón los ratones del modelo murino de LES contenían una mayor frecuencia de linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> en comparación a ratones sanos. Por otro lado, es importante señalar que tanto en ratones controles y LES el pulmón contiene un porcentaje significativamente mayor de linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> en comparación con el bazo (Figura 4 B). Importantemente, nuestros resultados muestran que hay un aumento significativo en el número de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> y linfocitos B de memoria con cambio de clase (IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) en el pulmón de ratones enfermos (Figura 4 C).

#### A Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>



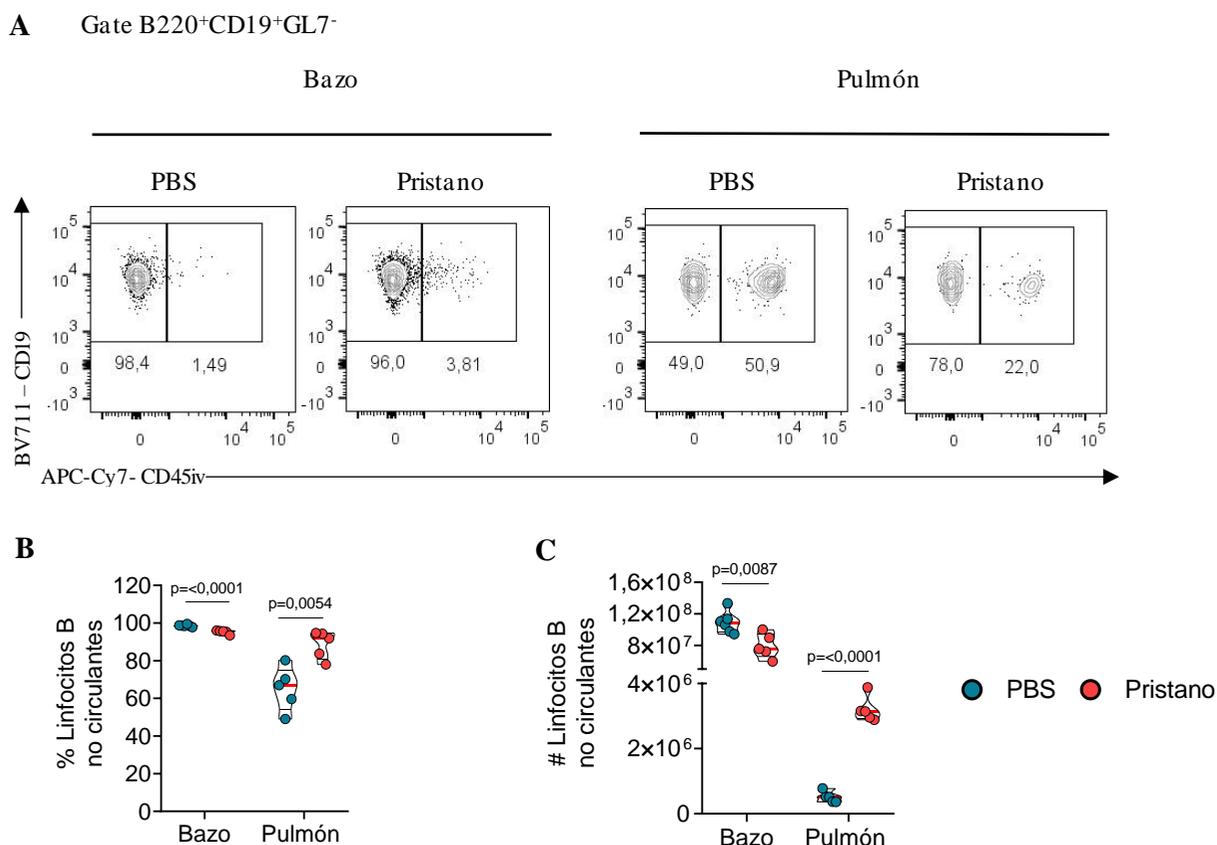


**Figura 4. El pulmón de los ratones del modelo murino de LES inducido presenta un aumento en el número de linfocitos B de memoria.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> y de cambio de clase en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C) Gráfico de número de linfocitos B en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=5). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. %, frecuencia; #, número.

#### 5.4 El pulmón de los ratones del modelo murino de LES posee un mayor porcentaje y número de linfocitos B de memoria no circulantes que el control

Los linfocitos BRM son una población que infiltra y se localiza en el parénquima de tejidos no linfoides (Allie y col., 2019). Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar si el mayor número de linfocitos B en el pulmón de ratones del modelo murino de LES está dado por una mayor cantidad de linfocitos B que han infiltrado este órgano (en este trabajo denominados linfocitos no circulantes). Para identificar y analizar los linfocitos B no circulantes, se utilizó el marcaje intravenoso con el anticuerpo anti-CD45 conjugado con el fluorocromo APC-Cy7. Este anticuerpo reconoce a todos los leucocitos y, al ser inyectado vía intravenosa, el anticuerpo circula a través de la sangre uniéndose a los leucocitos presentes en esta (CD45iv<sup>+</sup>), mientras que los leucocitos que se encuentran en el parénquima tisular o en los tejidos, que no están en contacto con este anticuerpo, están resguardadas del marcaje (CD45iv<sup>-</sup>). Primero se analizó la proporción de linfocitos B totales no circulantes (CD45iv<sup>-</sup>), y se observó que el pulmón de los ratones con

LES posee una mayor frecuencia de linfocitos B no circulantes totales que los ratones sanos. En el bazo se presentó una leve disminución de esta población en los ratones enfermos (Figura 5 A, B). Esta diferencia se vio reflejada en número total de los linfocitos B no circulantes, encontrando un número significativamente mayor de linfocitos B no circulantes en el pulmón de los ratones enfermos (Figura 5 C).

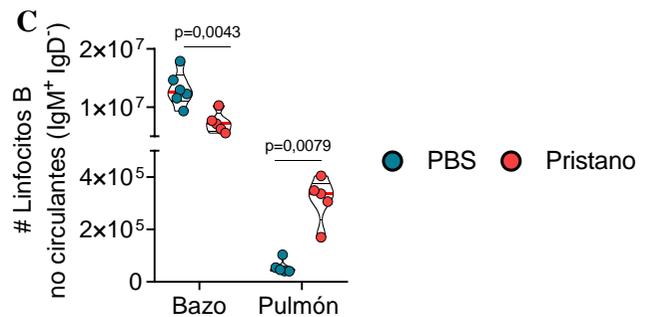
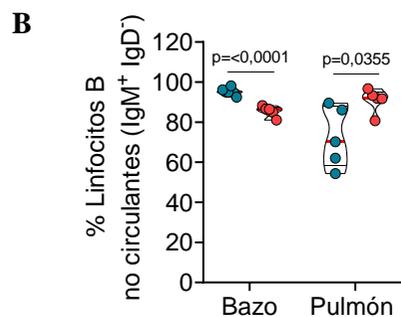
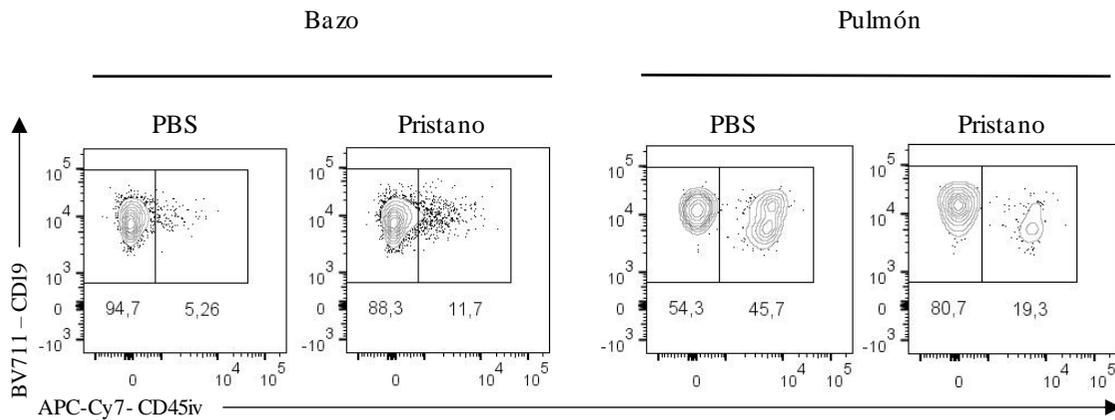


**Figura 5. El pulmón de los ratones del modelo murino de LES contiene una alta frecuencia y número de linfocitos B no circulantes.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos B no circulantes en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C) Gráfico de número de linfocitos B no circulantes en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=5). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

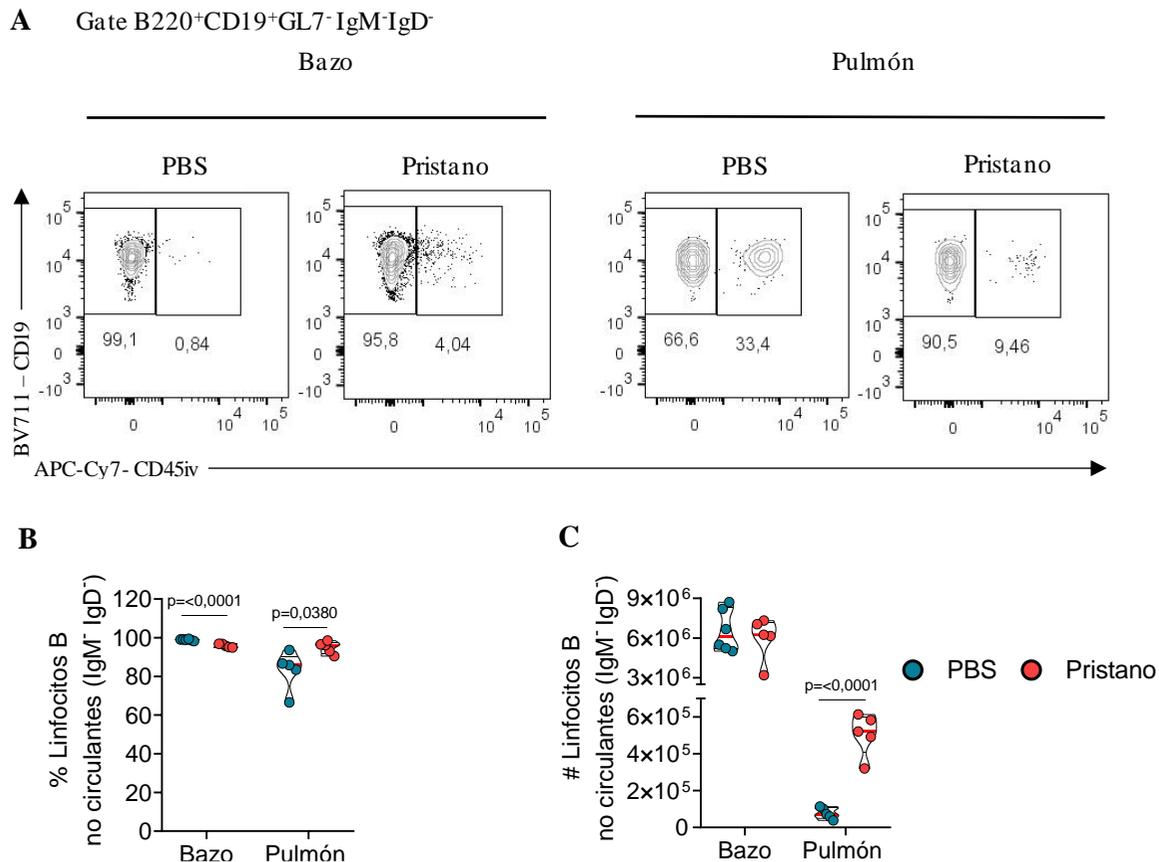
Los linfocitos B residentes de memoria pueden diferenciarse rápidamente en células secretoras de anticuerpos en la localidad del órgano afectado, por tanto, podrían ser un factor relevante en la reactivación de la enfermedad autoinmune. Dado esto, se determinó la frecuencia y número de la

población no circulante que compone a los linfocitos B de memoria que han realizado cambio de clase (IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>) y linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>. Mientras el bazo de los ratones del modelo murino de LES tuvo una disminución en la frecuencia de los linfocitos B no circulantes de memoria tanto IgM<sup>+</sup> como IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>, el pulmón presentó un aumento de la frecuencia en ambos tipos de linfocitos B de memoria, siendo la diferencia más significativa en los linfocitos que han hecho cambio de clase (Figura 6 A, B; 7 A, B). Esta diferencia se hace más notoria al evaluar el número de linfocitos B de memoria no circulantes, donde el pulmón también presentó un aumento en la condición con LES que en el control, siendo la diferencia más significativa en los linfocitos B con cambio de clase, mientras que el bazo solo tuvo diferencias significativas en los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> (Figura 6 C, 7 C). Por lo tanto, estos resultados indican que en el pulmón de los ratones del modelo murino de LES inducido por pristano hay una infiltración significativa de linfocitos B de memoria no circulantes.

**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



**Figura 6. Los linfocitos B de memoria  $IgM^+ IgD^-$  en el pulmón de ratones del modelo murino de LES son principalmente no circulantes.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos no circulantes ( $CD45^{iv^-}$ ) que componen a los linfocitos B de memoria  $IgM^+ IgD^-$  en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C) Gráfico de número de linfocitos B de memoria  $IgM^+ IgD^-$  no circulantes en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=5). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

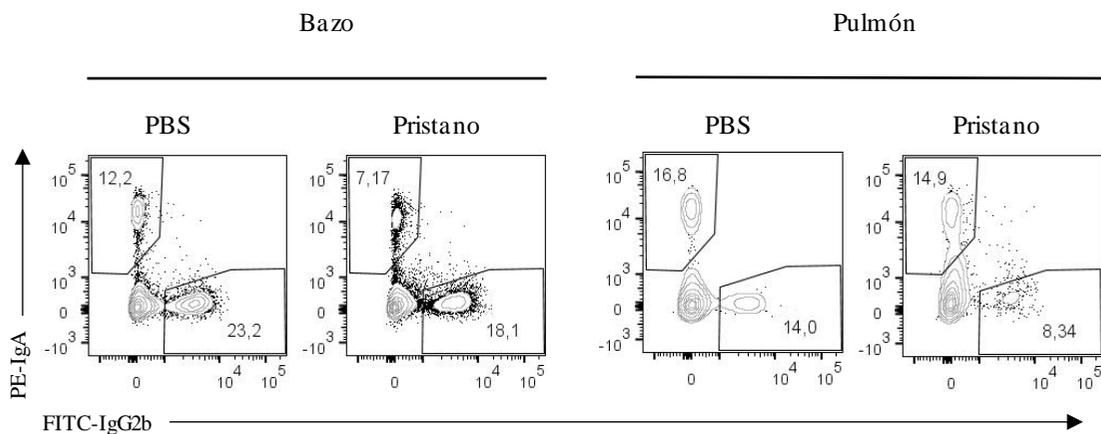


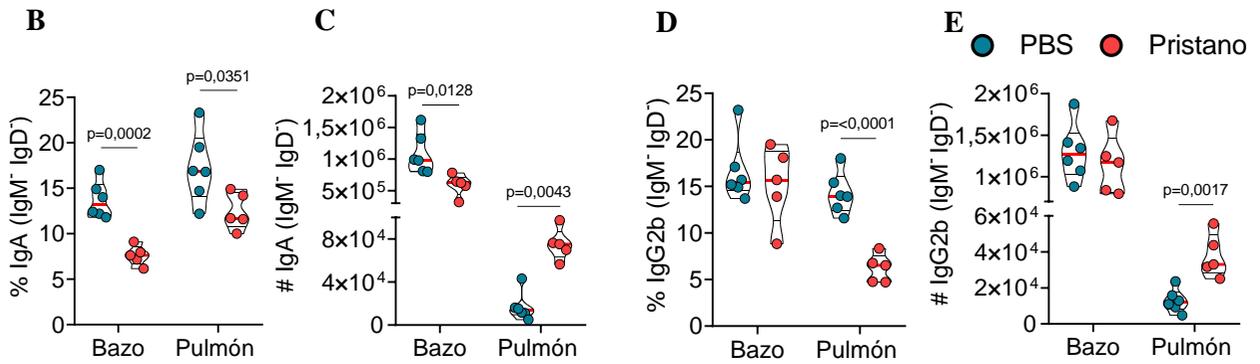
**Figura 7. Los linfocitos B de memoria  $IgM^- IgD^-$  en el pulmón de los ratones del modelo murino de LES son principalmente no circulantes.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos no circulantes ( $CD45^{iv^-}$ ) que componen a los linfocitos B de memoria  $IgM^- IgD^-$  en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C) Gráfico de número de linfocitos B de memoria  $IgM^- IgD^-$  no circulantes en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=5). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

## 5.5 Los órganos de los ratones del modelo murino de LES inducido por pristano presentan una disminución en la frecuencia de expresión de IgA e IgG2b

El cambio de clase de inmunoglobulina permite que los linfocitos B de memoria y células plasmáticas de larga vida expresen y secreten diferentes isotipos o subtipos de inmunoglobulinas, como IgG, IgA o IgE (Schroeder & Cavacini., 2010). De esta manera, se propuso evaluar la expresión de dos isotipos predominantes a nivel sistémico y en las mucosas como IgG2b e IgA en los linfocitos B de memoria no circulantes en el modelo de LES. Interesantemente, observamos que la frecuencia y número de linfocitos B IgA<sup>+</sup> se reduce de manera significativa en el bazo y pulmón de los ratones del modelo murino de LES inducidos con pristano en comparación con el grupo control (Figura 8 A, B). Por otra parte, observamos en el pulmón de ratones enfermos disminuye la proporción de linfocitos IgA<sup>+</sup> e IgG2b<sup>+</sup>, sugiriendo que hay una diferenciación o reclutamiento preferencial hacia otro isotipo (Figura 8 A, E). A pesar de encontrar una menor proporción de linfocitos IgA<sup>+</sup> e IgG2b<sup>+</sup>, el número absoluto de ambas poblaciones es significativamente mayor en el pulmón de ratones enfermos (Figura 8 C, E), lo cual está dado por el aumento del número total de células en este órgano en comparación con ratones sanos.

**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CD45iv<sup>-</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



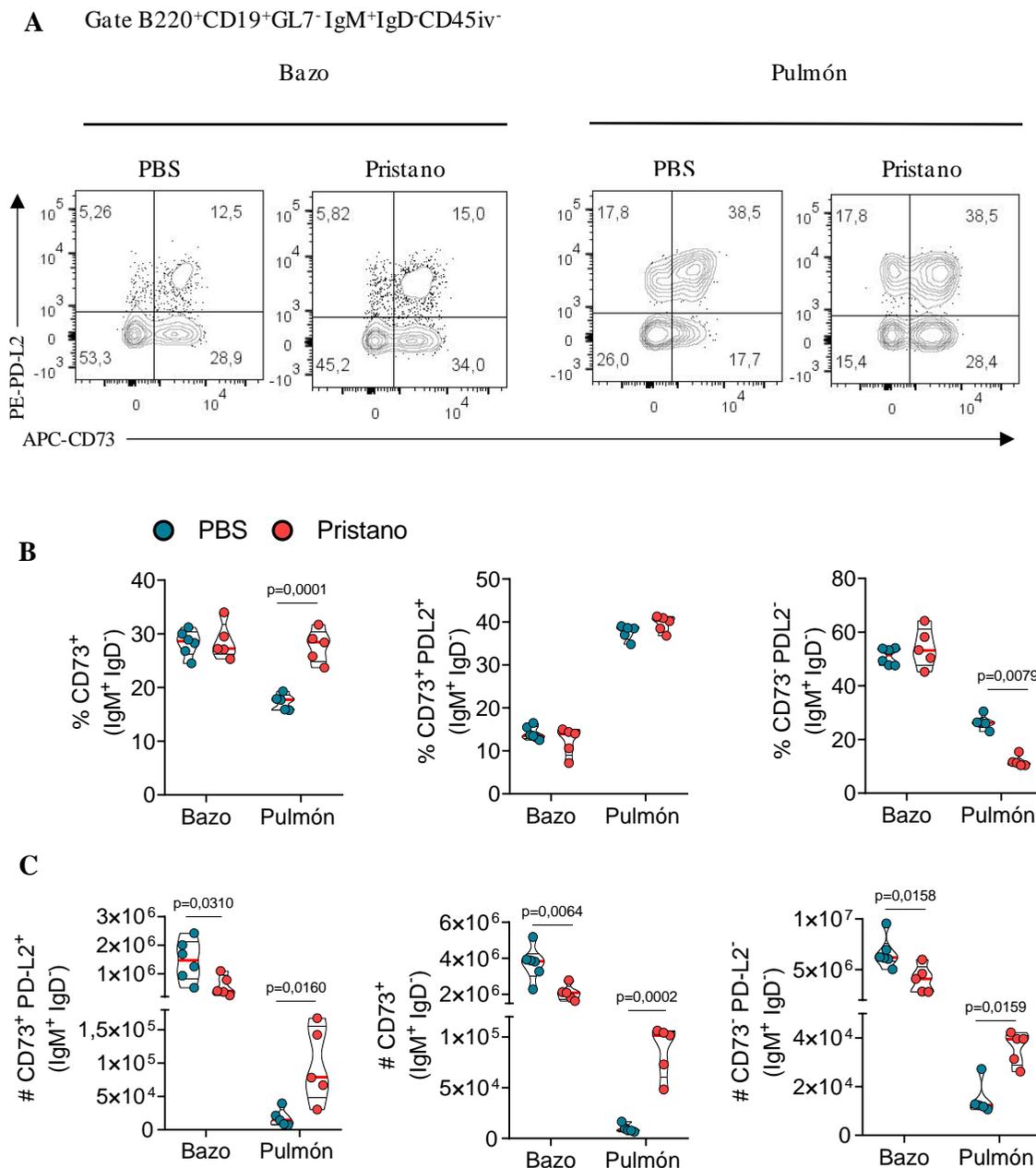


**Figura 8. Los linfocitos B de memoria con cambio de clase en el pulmón del modelo murino de LES tienen una menor frecuencia de IgA e IgG2b en comparación con el control.** (A-B-D) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes IgA e IgG2b en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C - E) Gráfico de número de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes IgA o IgG2b no circulantes en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=6). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

### 5.6 La frecuencia de los linfocitos B de memoria no circulantes del pulmón de los ratones del modelo murino de LES inducido son principalmente CD73<sup>+</sup>

A continuación, se analizó la composición de los distintos subtipos de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> y de cambio de clase no circulantes. dentro de las cuales se evaluó la expresión de las moléculas CD73 y PD-L2, cuya expresión está asociada con la capacidad efectora de estas células, una vez reactivadas, a diferenciarse en células plasmáticas o reingresar en la reacción de centro germinal (Dhenni & Phan., 2020). Al analizar los subtipos de linfocitos B memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>, se observó que en el bazo la frecuencia de poblaciones CD73<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> no variaron entre la condición LES inducida y el grupo control. En el pulmón se observaron diferencias como un aumento significativo de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>, de un ~17,3% en el grupo control a un ~27,7% en los ratones enfermos, asociada a una disminución de la frecuencia de los dobles negativos CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> de un ~26,4% a un ~11,8% de los ratones sanos y enfermos respectivamente (Figura 9 A, B). Para los tres subtipos de los linfocitos B de memoria

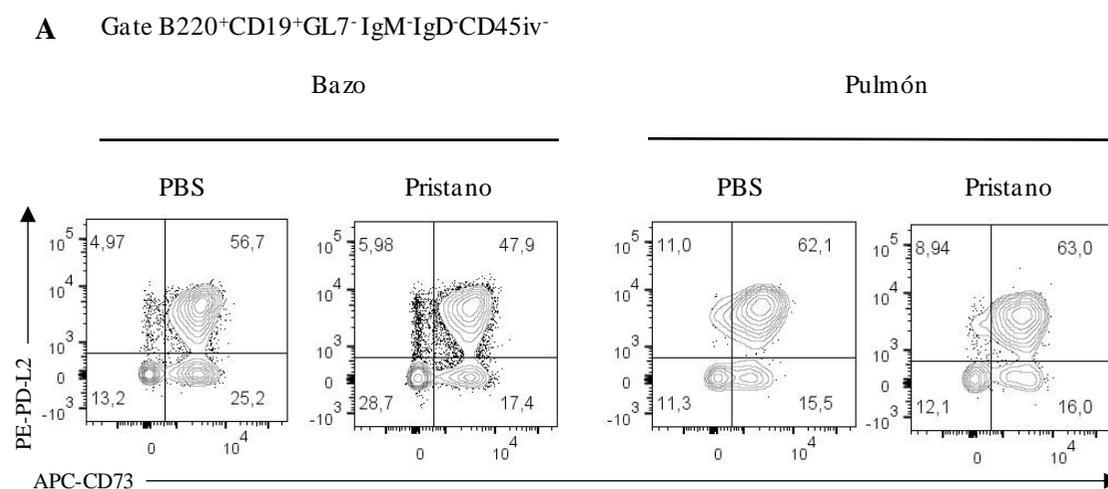
IgM<sup>+</sup>, ya sea CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>±</sup>PD-L2<sup>-</sup>, el número de los linfocitos en el bazo es significativamente menor en los ratones del modelo murino de LES inducido en comparación con el control, mientras que el pulmón de los ratones enfermos presenta un mayor número de linfocitos que los ratones sanos (Figura 9 C).

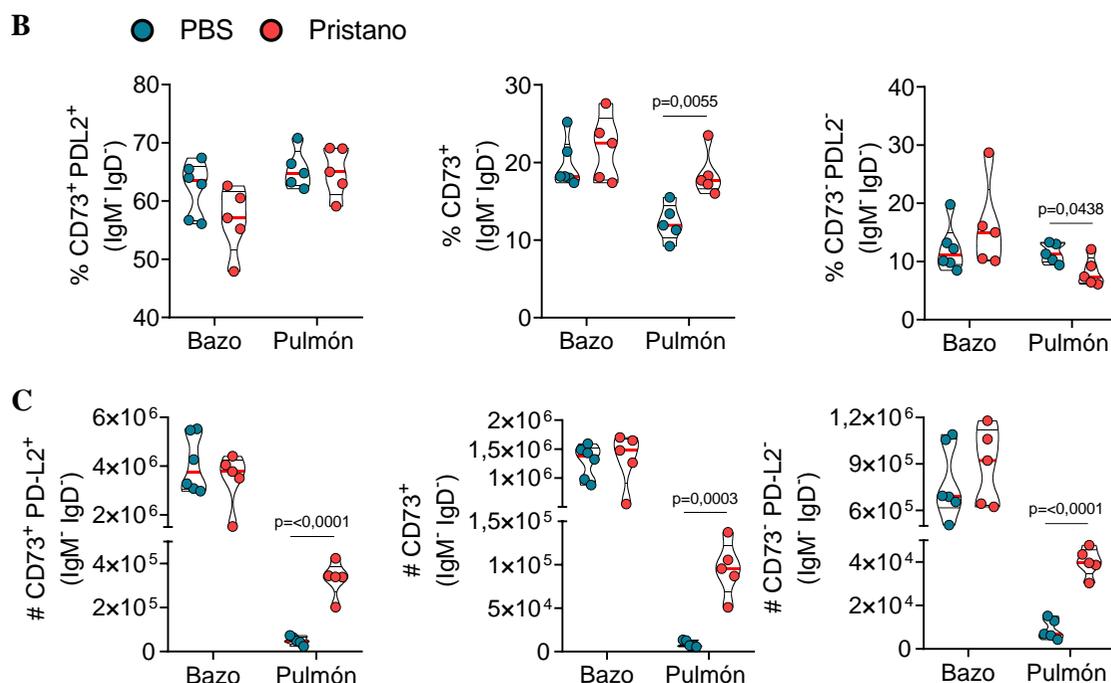


**Figura 9. Los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> no circulantes en el pulmón de los ratones enfermos presentan un aumento de CD73<sup>+</sup> en comparación con el grupo control.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> no circulantes CD73<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C) Gráfico de número de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> no circulantes CD73<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón

para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=6). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

En cuanto a la composición de los linfocitos B de memoria que han hecho cambio de clase IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>, también se encontró un aumento significativo en la frecuencia de los linfocitos CD73<sup>+</sup>, de un ~12,3 % a un ~18,5 % y una disminución de la frecuencia de CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> de un ~11,5 % a un ~8,3% de los ratones sanos y enfermos respectivamente. En el bazo no se observaron diferencias en ninguno de los 3 subtipos (Figura 10 A, B). Al analizar el número, en el bazo no hubo diferencias significativas con respecto a la cantidad de linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>+/-</sup>PD-L2<sup>-</sup> entre ambas condiciones, mientras que en el pulmón se observaron aumentos en la cantidad en las tres subpoblaciones analizadas. Estos resultados muestran que en el LES los linfocitos B de memoria no circulantes presentes en el pulmón contienen una mayor proporción que expresa CD73. En el caso de las células de memoria IgM<sup>+</sup>, estas serían capaces de diferenciarse rápidamente en células plasmáticas, mientras que los linfocitos B de memoria con cambio de clase tendrían una predisposición a reingresar en la reacción de centro germinal.





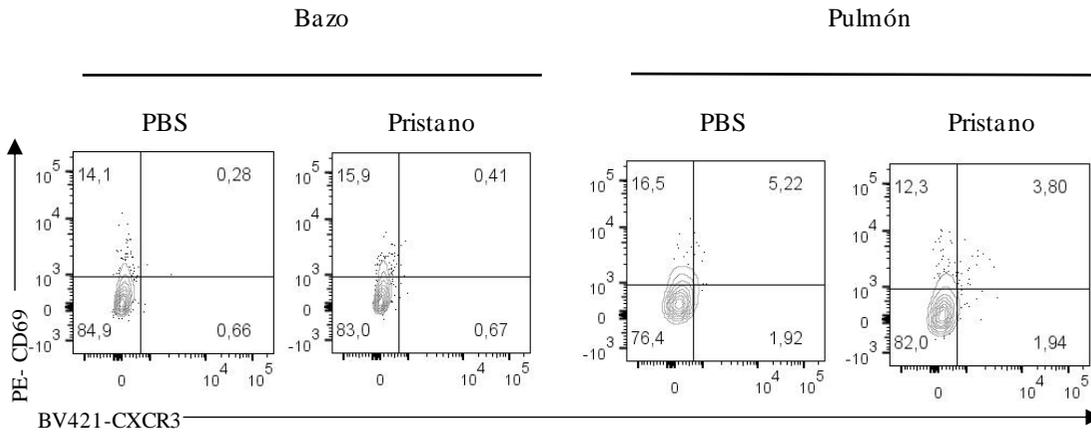
**Figura 10. Los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes en el pulmón de los enfermos presentan un aumento de CD73<sup>+</sup> en comparación con el grupo control.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes CD73<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> en las condiciones LES y control del bazo y pulmón (C) Gráfico de número de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes CD73<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=6). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

### 5.7 El pulmón de los ratones del modelo de LES posee una disminución en la frecuencia de los marcadores de residencia, pero un aumento en el número en comparación con el grupo control

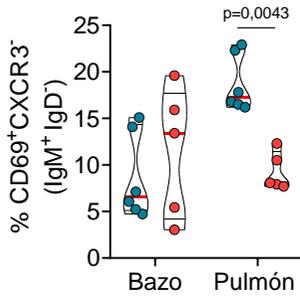
Para demostrar y caracterizar la presencia de linfocitos B de memoria residentes que componen a la población no circulante se evaluó la expresión de marcadores de residencia que son típicos de los linfocitos T de memoria residentes, como una alta expresión de CXCR3 y CD69 (Allie & Randall., 2020). Por lo tanto, analizamos la expresión de estos marcadores en la población de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes en los ratones sanos y enfermos. En

primer lugar, se analizó el marcador CD69 en conjunto con la expresión de CXCR3 en los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>. Como se muestra en la Figura 11 A, observamos que, tanto en bazo como pulmón, la mayoría de estas células carece de ambos marcadores, y sólo una proporción pequeña expresa CD69 en ambos órganos. Contrario a lo esperado, la frecuencia de CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> en el pulmón de los ratones enfermos tuvo una reducción significativa en contraste con el control. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número total de esta subpoblación (Figura 11 B, C). Por otra parte, la frecuencia de células CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> fue minoritaria en bazo y pulmón (Figura 11 A), observando un leve aumento en el número total de esta población en el pulmón de ratones enfermos (Figura 11 A, D, E). Al evaluar la expresión de CD69 y CXCR3 en linfocitos B de memoria con cambio de clase, se pudo observar que esta población expresa mayores niveles de CD69 en el pulmón con respecto al bazo (Figura 11 F). Al igual que en los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>, se observa una disminución en la proporción de células CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> en el pulmón de ratones enfermos (Figura 11 F, G), lo cual sugiere que la mayoría de los linfocitos B de memoria que están infiltrando el pulmón no expresan marcadores de residencia. Aun así, se observa un leve aumento en el número total de células CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> en el pulmón de ratones enfermos. Similar a lo observado en los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>, la frecuencia de células CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> fue minoritaria en bazo y pulmón (Figura 11 F), observando un leve aumento en el número total de esta población en el pulmón de ratones enfermos (Figura 11 H). En conjunto, a pesar de encontrar un leve aumento en el número total de linfocitos B de memoria que expresan marcadores de residencia, nuestros resultados sugieren que la mayoría de las células de memoria que se acumulan en el pulmón del modelo de LES no expresan en su mayoría marcadores de residencia de tejido.

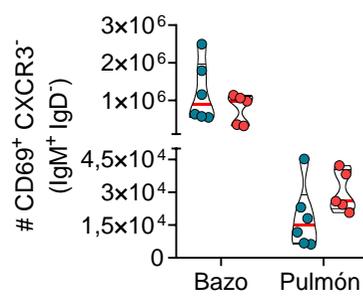
**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CD45iv<sup>-</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



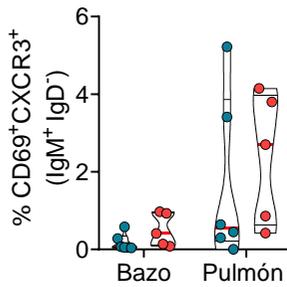
**B** ● PBS ● Pristano



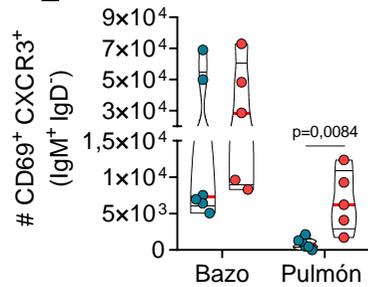
**C**



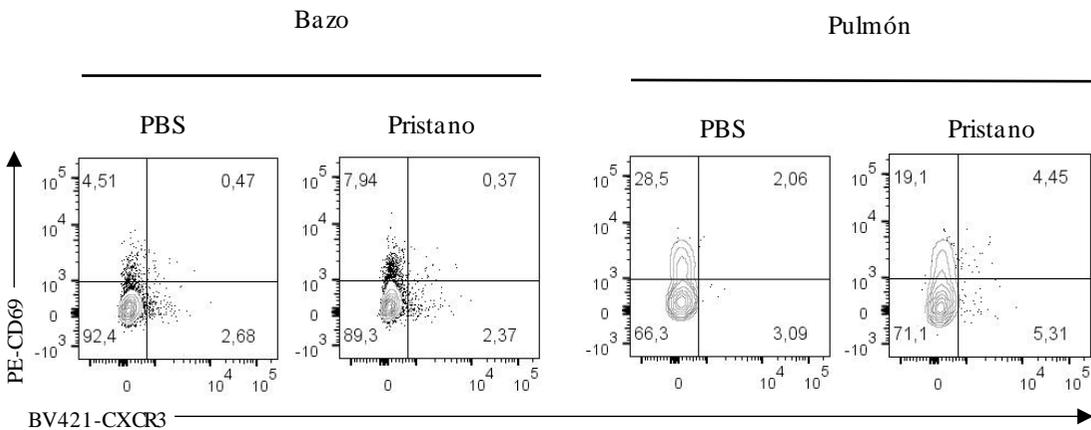
**D**

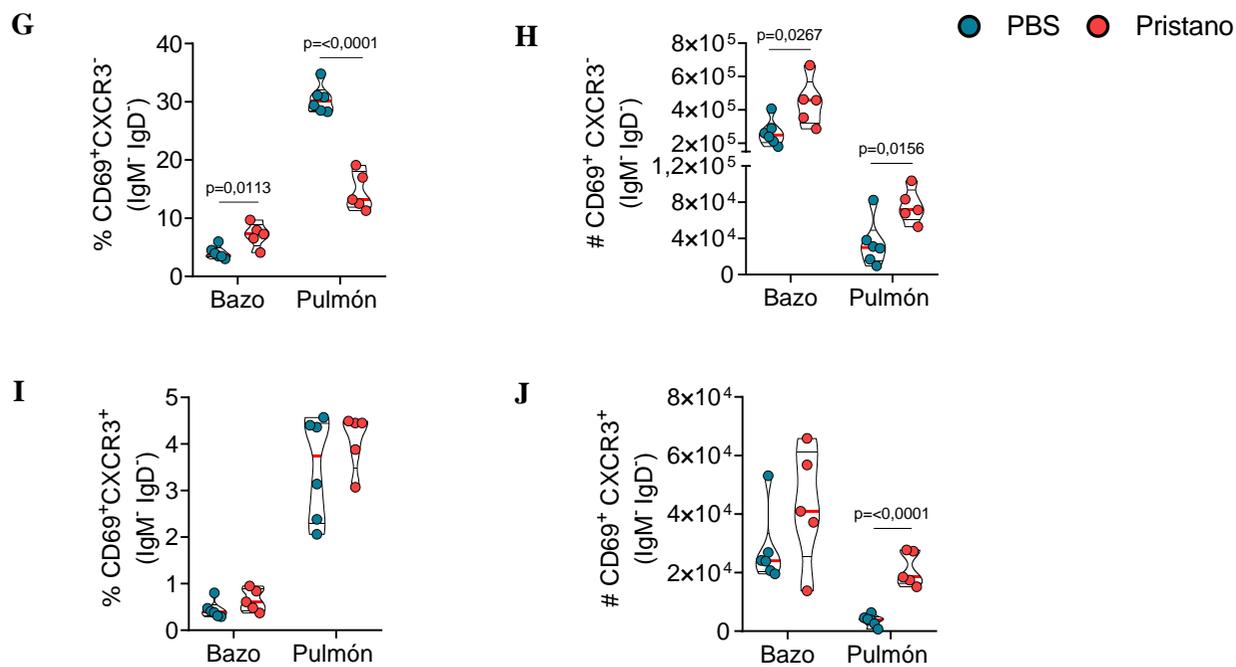


**E**



**F** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CD45iv<sup>-</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



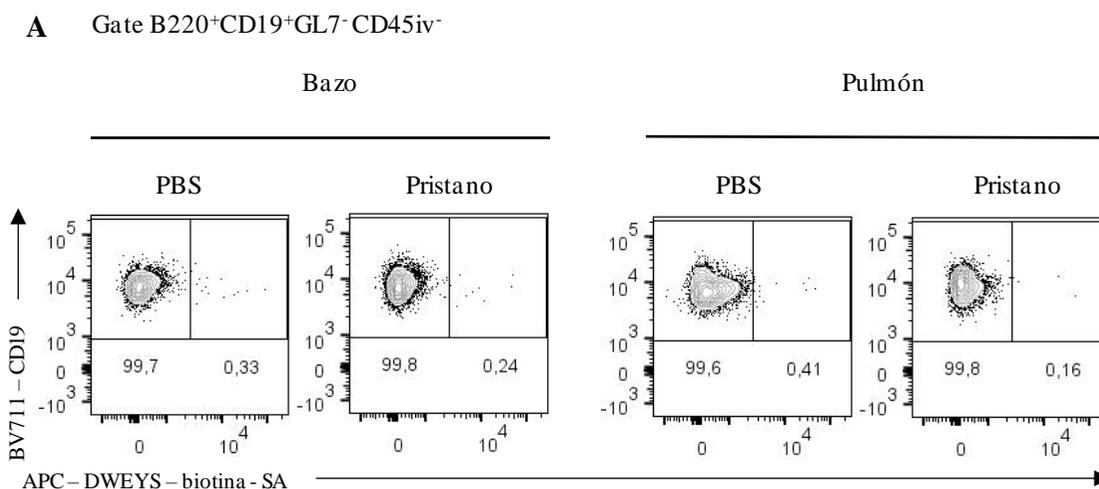


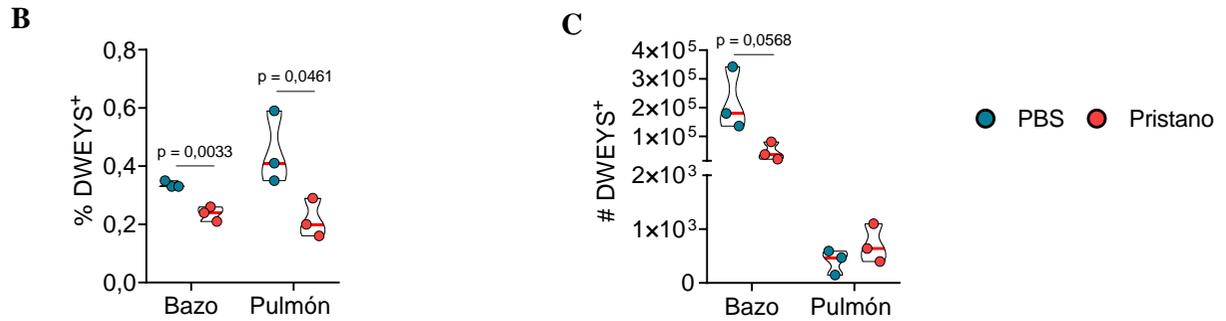
**Figura 11. El bazo y pulmón de ratones del modelo murino de LES tienen una disminución en la frecuencia de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> residentes (A-B-D) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> no circulantes CD69<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de los ratones del modelo murino de LES y control en bazo y pulmón (C-E) Gráfico de número de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> no circulantes CD69<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en las condiciones LES y control. (F-G-I) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> no circulantes CD69<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> de los ratones del modelo murino de LES y control en bazo y pulmón (H-J) Gráfico de número de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> no circulantes CD69<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5) y pulmón (n=5); para el grupo control en bazo (n=6) y pulmón (n=6). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.**

### 5.8 El bazo y el pulmón en los ratones del modelo de LES presentan una tendencia al aumento de los linfocitos autorreactivos

Nuestros resultados indican que los ratones del modelo de LES inducido por pristano tienen un mayor número de linfocitos B de memoria que infiltran el parénquima tisular comparado con ratones sanos. Por lo tanto, nos interesó evaluar si esta población residente contiene células autorreactivas, lo cual corresponde al segundo objetivo de este seminario. Para detectar a los

linfocitos B autorreactivos se utilizó una técnica previamente descrita que consiste en utilizar un péptido tetramérico biotinilado que actúa como un mimetopo de dsDNA, denominado DWEYS. Este péptido se incubó con estreptavidina conjugada con un fluorocromo. La estreptavidina (SA) es una proteína que se caracteriza por su alta afinidad por la biotina; de esta forma, permite unirse al péptido por medio de la biotina, y funcionar como un marcador de células autorreactivas contra dsDNA. Al unirse el complejo péptido-biotina-SA-fluorocromo a las células que son autorreactivas, estas pueden ser identificadas por citometría de flujo (Jacobi y col., 2009; Newman y col., 2003; Wangriatisak y col., 2021). Al analizar la composición de los linfocitos B autorreactivos de los ratones del modelo de LES inducido y los ratones sanos en el bazo y pulmón, estos correspondían a menos 0,5 % de los linfocitos; además, se observó que en la condición control, tanto para el bazo como en el pulmón, hubo una mayor población autorreactiva que en los ratones del modelo de LES, lo cual es un resultado contradictorio con la literatura, dado que, a pesar de que es posible encontrar linfocitos autorreactivos en los ratones sanos, estos no debiesen ser mayores que en una enfermedad que es característica por la activación de linfocitos B autorreactivos que tienen especificidad por dsDNA (Jacobi y col., 2009) (Figura 12 A, B, C).

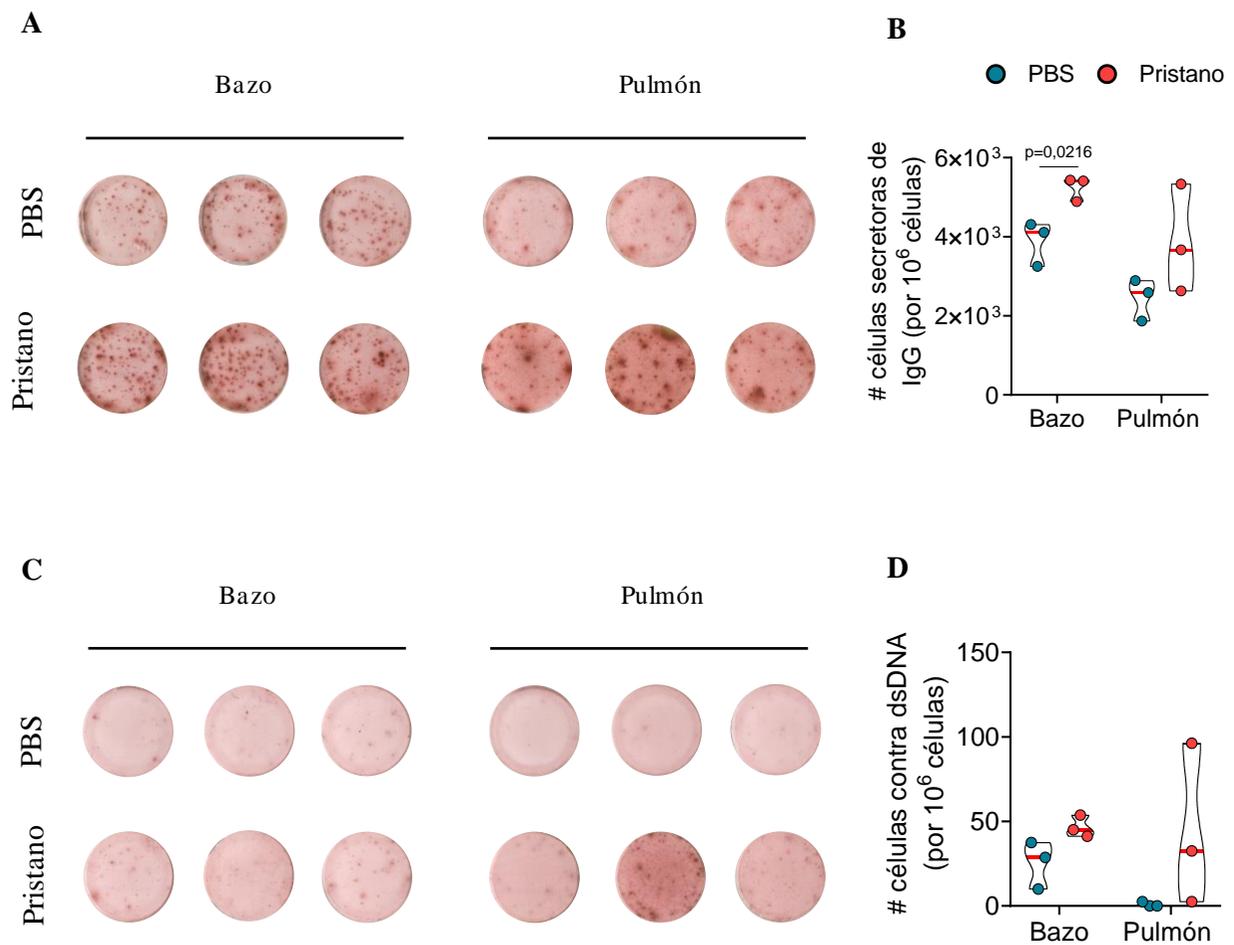




**Figura 12. El bazo y pulmón de los ratones del modelo murino con LES presentan un menor porcentaje de linfocitos B autorreactivos que los ratones sanos (A - B)** Gráfico de citometría de flujo y frecuencia de los linfocitos B no circulantes DWEYS<sup>+</sup> de los ratones del modelo murino de LES y control en bazo y pulmón. (C) Gráfico de número de linfocitos B no circulantes DWEYS<sup>+</sup> en las condiciones LES y control. Para los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=3) y pulmón (n=3); para el grupo control en bazo (n=3) y pulmón (n=3). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

Dado que los resultados obtenidos al utilizar el péptido como marcador de los linfocitos autorreactivos no fueron acordes con la literatura ni la naturaleza de la propia enfermedad, se realizó un ensayo ELISpot como experimento alternativo para poder determinar la presencia de células productoras de anticuerpos autorreactivos en bazo y pulmón. Se cuantificaron tanto las células secretoras de IgG anti-dsDNA como el número total de células secretoras de IgG. Sin embargo, las limitaciones de este método radican en la imposibilidad de discernir a los linfocitos B no circulantes de los circulantes, pero permite tener una aproximación al considerar que, mediante el marcaje intravascular, en el bazo y pulmón la proporción de no circulantes era por sobre el 80%. Observamos que el bazo de ratones enfermos presentó un aumento significativo del número de células secretoras de IgG y una tendencia no significativa en los pulmones en comparación a los ratones sanos (Figura 13 A, B). Además, fue posible detectar células productoras de anticuerpos anti-dsDNA en el bazo de ratones sanos y enfermos, sin encontrar diferencias significativas en el número total de estas (Figura 13 C, D). Interesantemente, también se detectaron células autorreactivas en el pulmón de ratones enfermos, mientras que estas no fueron

detectadas en el pulmón de ratones sanos (Figura 13 C, D). De acuerdo con estos resultados, se lograron detectar linfocitos B autorreactivos en el pulmón de ratones del modelo de LES, de los cuales una alta proporción probablemente corresponde a células no circulantes que están en el parénquima. Esto se podría confirmar o reafirmar al aumentar el tamaño muestral de estos experimentos, donde probablemente se pudiese observar de mejor forma esta tendencia con diferencias significativas.



**Figura 13 El bazo y pulmón de los ratones del modelo murino de LES presentan una tendencia a presentar células secretoras de IgG autorreactivos.** (A) ELISpots representativos para la evaluación de células secretoras de IgG en la condición con LES y control para bazo y pulmón. (B) número de células secretoras de IgG normalizado por cada  $1 \times 10^6$  células. (C) ELISpots representativos para la evaluación de células autorreactivas contra dsDNA en la condición con LES y control para el bazo y pulmón. (D) número de células autorreactivas normalizado por cada  $1 \times 10^6$  células. Para los ratones con LES y control: bazo (n=3) y pulmón (n=3). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon solamente entre las condiciones control y LES de cada órgano con una prueba no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. %, frecuencia; #, número.

## 6. DISCUSIÓN

El establecimiento de los linfocitos B de memoria residentes en tejidos (BRM) corresponden a un interesante descubrimiento que permitió ampliar nuestro entendimiento de las funciones de linfocitos B y su implicancia en la defensa de los tejidos que están en constante exposición a agentes infecciosos. De estas investigaciones la mayoría se han centrado en caracterizar esta población en el pulmón en el contexto de infecciones respiratorias tales como la influenza y la neumonía. No obstante, se desconoce si los BRM también se pueden establecer en otro tipo de enfermedades, como aquellas de origen autoinmune donde ocurre una activación de linfocitos B autorreactivos, como lo es el lupus eritematoso sistémico. En este trabajo como primer objetivo se propuso caracterizar a los linfocitos B no circulantes y evaluar dentro de esta población la existencia de los linfocitos BRM en órganos linfoides y no linfoides en la enfermedad autoinmune del lupus eritematoso sistémico en el modelo murino BALB/c de LES inducido por pristano. Se evaluaron en órganos linfoides (bazo y ganglios mediastinales) y no linfoides (pulmón y riñón) donde posiblemente se establecerían los BRM dado que estos dos últimos tejidos resultan severamente afectados producto de la capilaritis pulmonar y nefritis grave asociada a la enfermedad. Se utilizó la cepa BALB/c a la cual se le indujo el LES mediante una inyección por pristano.

En el modelo de LES utilizado en este trabajo confirmamos que efectivamente presenta síntomas del LES en humanos como niveles de autoanticuerpos elevados y artritis, siendo este último una de las manifestaciones más comunes entre los pacientes, puesto que entre un 69% al 95% de las personas con LES la padecen (Grossman., 2009). Se ha descrito que la inducción de LES en esta cepa de ratón genera depósitos de complejos inmunitarios en el riñón que provocan proteinuria grave y nefritis, sin embargo, en nuestro caso, no se desarrolló, como se pudo evidenciar en los

bajos niveles de proteinuria en orina (Perry y col., 2011). Si bien la mayoría de los estudios del modelo de LES inducido con pristano evalúa el desarrollo de la nefritis a los 6 meses, también se ha reportado que este síntoma se puede desarrollar tardíamente entre los 6-8 meses posterior a la administración de pristano (Summers y col., 2010; Richard & Gilkeson., 2018). Posiblemente, si nuestro diseño experimental se hubiera extendido por mayor tiempo se habría detectado nefritis grave posterior a los 6 meses.

Luego de confirmar que nuestro modelo indujo síntomas del LES, se procedió al análisis de los fenotipos de los linfocitos en cada órgano. Nuestros datos muestran que, aunque no varió de manera significativa la frecuencia de los linfocitos B, el número de células aumentó de manera significativa en los ganglios mediastinales y el pulmón en los ratones del modelo murino de LES, mientras que en el bazo se presentó una reducción del número de linfocitos B en comparación con los ratones control. El riñón, en cambio, no presentó diferencias entre los ratones sanos y los enfermos, lo cual es consistente con que, en nuestro modelo no se produjo daño renal evidente. Por otro lado, los linfocitos B no circulantes aumentaron en el pulmón de los ratones del modelo de LES en comparación al control, mientras que en el bazo hubo una disminución. El aumento de los linfocitos B no circulantes que estarían localizados en el parénquima del pulmón de los ratones del modelo de LES sugiere un reclutamiento linfocitario en el órgano asociado a la enfermedad. Esto es consistente a lo observado en pacientes con LES en donde el pulmón presenta infiltración de células inmunitarias asociadas generalmente a una capilaritis pulmonar (Al-Adhoubi & Bystrom 2020; Chowdhary y col., 2007). De hecho, en ratones C57BL/6 la inyección de pristano desencadena en una capilaritis pulmonar con infiltrados perivasculares de linfocitos, macrófagos, neutrófilos, y eosinófilos (Reeves y col., 2009); y, aunque el modelo BALB/c de LES inducible por pristano no genera capilaritis pulmonar, si se ha reportado inflamación del tejido pulmonar (neumonitis) acompañado por infiltrados inflamatorios perivasculares (Leiss y col., 2013). Por

otro lado, la reducción de linfocitos B en el bazo, tanto en frecuencia como en número total de células, es posible que sea producto de la activación y migración de estas células hacia otros tejidos inflamados. Serían necesarios experimentos adicionales para responder si existe migración de células del bazo hacia otros sitios como el pulmón. Un estudio que ha abordado el establecimiento de linfocitos B de memoria en el contexto de infecciones pulmonares reportó que el porcentaje de linfocitos B de memoria extravasculares (en este trabajo llamados “no circulantes”) en el pulmón aumenta significativamente tras la infección (Barker y col., 2021). Aquí demostramos, de igual manera, que en el LES la población de linfocitos B de memoria presentes en el pulmón eran principalmente no circulantes, siendo esta población significativamente mayor en los ratones enfermos. Por otra parte, en el bazo, tuvieron una menor o igual frecuencia y un número menor, dependiendo de si se trataba de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> o de cambio de clase. Por lo tanto, en el modelo murino de LES estudiado en este trabajo, hay un aumento de los linfocitos B de memoria no circulantes en el pulmón, mientras que, en el bazo, hay una disminución.

Un área que ha tenido considerable atención en los últimos años es la identificación de nuevos marcadores fenotípicos para definir y caracterizar linfocitos B de memoria generados en respuesta a infección o inmunización. Una gran proporción expresa las moléculas CD73 y PD-L2 por separado, o co-expresan ambas moléculas (Allie y col., 2019; Tomayko y col., 2010; Cancro & Tomayko., 2021). Estudios en los cuales se han identificado linfocitos BRM en modelo murino de infección con influenza y neumonía, han descrito que posterior a la infección, los linfocitos B de memoria no circulantes en el pulmón en su mayoría expresan los marcadores CD73 y PD-L2 en comparación con las contrapartes circulantes y los órganos linfoides secundarios (Barker y col., 2021; Tan y col., 2022). Consistentemente, en nuestros resultados encontramos que los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> y con cambio de clase en su mayoría expresan CD73 o co-expresan CD73 y PD-L2. Además, observamos que los linfocitos B de memoria del pulmón de los ratones del

modelo de LES tienen un aumento en la frecuencia de CD73<sup>+</sup> tanto en los linfocitos B de memoria con cambio de clase como en los IgM<sup>+</sup>. La proporción de células CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> no presentaron diferencias significativas, aunque se pudo observar un aumento en el número total de esta población en el pulmón de los ratones enfermos. Estos datos sugieren que los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> en el pulmón tendrían mayor capacidad de diferenciarse a células plasmáticas, y los linfocitos B de memoria con cambio de clase tendrían una mayor predisposición a reingresar en la reacción del centro germinal.

El cambio de clase de inmunoglobulina en los linfocitos B de memoria determina las funciones efectoras que tendrán al reactivarse y producir anticuerpos. Por tanto, es de gran interés estudiar el patrón de expresión de inmunoglobulinas tanto en respuestas a infecciones como en enfermedades autoinmunes. Observamos que la frecuencia de linfocitos B de memoria que expresan IgA es mayor en el pulmón en relación con el bazo tanto en los controles como en los ratones enfermos. Esto es consistente con hallazgos de que las BRM de pulmón normalmente contienen una mayor proporción de IgA en relación con los linfocitos B de memoria de la sangre y bazo (Tan y col., 2022). Además, cuando se induce una infección con influenza hay un mayor cambio de isotipo a IgA en el pulmón que en otros órganos linfoides (Onodera y col., 2012). Aun así, es importante destacar que en infecciones respiratorias virales y bacterianas se inducen principalmente células de memoria IgG tanto en pulmón como en otros órganos linfoides (Onodera y col., 2012; Allie y col., 2019; Barker y col., 2021; Tan y col., 2022). Nuestros resultados muestran que el desarrollo de LES está asociado a una reducción de los linfocitos B de memoria IgA tanto para el bazo como el pulmón, en relación con los ratones sanos. Interesantemente, en el pulmón de ratones enfermos también encontramos una reducción en la frecuencia de linfocitos B de memoria IgG2b, que es un isotipo predominante en la respuesta humoral del pulmón (Allie y col., 2019; Barker y col., 2021). Estos resultados sugieren que los linfocitos de memoria que se

acumulan en el pulmón durante el LES son preferentemente de otra subclase de IgG. Al respecto, un estudio muestra que al analizar el suero de ratones NZBWF1 que desarrollan LES, las subclases de IgG predominantes son la IgG2a e IgG3 (Wellmann y col., 2001). Por lo tanto, un desafío futuro sería evaluar de forma exhaustiva la expresión de otras subclases de IgG en el modelo de LES inducido por pristano. Luego de establecer el fenotipo de los linfocitos no circulantes en los respectivos órganos; lo siguiente fue determinar si esta población genera residencia en los tejidos al evaluar la expresión de marcadores de residencia. Se han realizado esfuerzos en determinar los marcadores responsables de la migración de los linfocitos B de memoria a los sitios de infección; la mayoría de las investigaciones concluyen que estos son compartidos con los linfocitos T residentes, como son CD69 y CXCR3, los cuales han sido ampliamente caracterizados (Mueller y col., 2013; Allie & Randall., 2020). Numerosos estudios coinciden que, tras una infección o inmunización respiratoria, los linfocitos B de memoria del pulmón muestran una expresión elevada de CD69 y CXCR3 (Onodera y col., 2012; Allie y col., 2019; Barker y col., 2021; Tan y col., 2022; Maclean y col., 2022; Gregoire y col., 2022). Nuestros resultados muestran que hay una mayor proporción de linfocitos B CD69<sup>+</sup> en el pulmón en comparación con el bazo tanto para los controles como para los ratones enfermos, indicando que hay un enriquecimiento en células con residencia tisular en este órgano. Contrario a lo esperado, en el LES hay una disminución en la frecuencia de los linfocitos B de memoria CD69<sup>+</sup> en el pulmón en relación con el control, mientras que el bazo presentó un aumento leve pero significativo en los linfocitos B con cambio de isotipo. No hubo diferencias significativas en la frecuencia de los linfocitos B de memoria dobles positivos, además de representar una frecuencia menor del 6% en el pulmón y del 2% en el bazo. Estos resultados reafirman que en el pulmón hay una infiltración de linfocitos B de memoria, pero que estos no expresan marcadores de residencia tisular. Por otra parte, un estudio ha reportado que para el establecimiento de linfocitos B de memoria IgA<sup>+</sup> residentes en el pulmón se requiere de CXCR3, lo cual, en nuestro caso, podría explicar la disminución de la expresión de IgA tanto en el pulmón

como en el bazo (Oh y col., 2021). Interesantemente, un estudio reciente muestra que, ante una infección pulmonar, se generan BRM CXCR3<sup>+</sup> *bona fide* (auténticos) y BRM CXCR3<sup>-</sup> *bystander* (espectadores). Estos últimos no son específicos contra la infección, sin embargo, son capaces de retener antígenos localmente mediante la unión de complejos inmunes (Gregoire y col., 2022). Por tanto, la expresión de marcadores como CXCR3 por sí sola no permite concluir definitivamente si los linfocitos B son una población residente de tejido. Es importante enfatizar que aún no se han determinado los marcadores definitivos de residencia que sean propios de los linfocitos B, por lo que una importante proyección de estudio a futuro sería poder determinarlos; esto permitiría simplificar su detección por medio de citometría de flujo, dado que por el momento, el procedimiento experimental definitivo para demostrar que una población celular particular reside en un tejido y no recircula es la parabiosis, es decir, la unión quirúrgica de la piel entre dos ratones lo que da como resultado la anastomosis de la vasculatura y por consecuencia el equilibrio entre las células circulantes, mientras que las células residentes no se equilibran, lo que proporciona evidencia de residencia en el tejido (Szabo y col., 2019).

El segundo objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar mediante citometría de flujo los linfocitos B de memoria no circulantes autorreactivos. Para esto se utilizó un péptido, denominado DWEYS acoplado a un fluorocromo, que actúa como un mimetopo de dsDNA (Jacobi y col., 2009). Sin embargo, nuestros resultados fueron inconsistentes, probablemente asociado a la unión inespecífica de la estreptavidina a los receptores, dado que, en el control sin péptido, es decir incubado solo con estreptavidina, se logró observar una población positiva; además, la frecuencia de unión al tetrámero era mayor en el control que en los ratones del modelo murino de LES, lo cual es contradictorio a lo que se esperaba en base a la literatura y la naturaleza de la enfermedad (Jacobi y col., 2009). Por lo tanto, como alternativa, se realizó un ELISpots para detectar de manera fiable las células autorreactivas. Como era esperable, en el pulmón de los ratones sanos no se

detectaron células autorreactivas mientras que los ratones del modelo murino de LES presentaron un aumento de estos en dos de los tres ratones analizados. En el bazo se detectaron células autorreactivas tanto en el control como en el LES, siendo mayor en los ratones del modelo murino de LES que el control. También evaluamos el número de células secretoras de IgG, dado que el lupus eritematoso sistémico (LES), y otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR), se caracteriza por títulos elevados de autoanticuerpos IgG en suero (Meffre & Wardemann., 2008). En ambos órganos tuvieron un aumento de los niveles de células secretoras IgG<sup>+</sup> en la condición de LES, sin embargo, con este método no pudimos identificar a los linfocitos B de memoria no circulantes ni caracterizar en profundidad su fenotipo, pero nos permitió tener una idea sobre los autoanticuerpos presentes en el órgano y la autorreactividad de las células, sean estas transeúntes o no circulantes, y cómo la enfermedad genera un aumento de estos en los respectivos órganos. A futuro, sería relevante la estandarización de un protocolo para detectar linfocitos autorreactivos para poder ser identificados mediante citometría de flujo y así poder esclarecer la autorreactividad de los linfocitos B de memoria que se infiltran al pulmón.

En resumen, en este trabajo se demostró que la inducción de LES en el modelo de ratón BALB/c generó una infiltración de linfocitos B de memoria CD73<sup>+</sup> al pulmón, sin embargo, estas células no recapitulan el fenotipo de residencia tisular que se ha descrito en el contexto de infecciones respiratorias. A futuro sería relevante corroborar con otros modelos, como aquellos de origen genético, la capacidad de residencia de los linfocitos B, y poder confirmar mediante parabiosis que efectivamente se trate de una población residente. Además, es importante poder esclarecer los marcadores de residencia de los linfocitos B y estandarizar un protocolo de detección de linfocitos autorreactivos mediante citometría de flujo.

## 7. CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en el modelo de LES inducido por pristano ocurre una infiltración significativa de linfocitos B de memoria en el pulmón. Los linfocitos B que se acumulan en el pulmón son fenotípicamente distintos de los linfocitos B de memoria en el grupo control, ya que presentan mayor expresión de CD73. Por otra parte, los linfocitos B de memoria que infiltran el pulmón en el modelo de LES poseen una menor frecuencia de células que expresan el isotipo IgA e IgG2b, lo cual sugiere que en la enfermedad se está promoviendo el cambio de clase hacia otro subtipo de IgG. Contrario a lo esperado, los linfocitos B que se acumulan en el pulmón del modelo de LES en su mayoría no expresan moléculas CD69 y CXCR3, típicamente asociadas a residencia tisular, en contraste a lo observado en los BRM en el contexto de las infecciones respiratorias. También es importante destacar que el daño renal es una afección común en los pacientes y modelos murinos de LES, sin embargo, el modelo implementado en este trabajo no desarrolló nefritis, motivo por el lo cual no se continuó estudiando las subpoblaciones de linfocitos B en el riñón. Estudios futuros en otros modelos murinos de LES debiesen abordar la interrogante si se establecen BRM en el riñón. Por otra parte, se lograron detectar linfocitos B autorreactivos en el pulmón de ratones del modelo murino de LES, de los cuales una alta proporción probablemente corresponde a células no circulantes que están en el parénquima. En conjunto, estos datos aportan evidencia de que en el lupus eritematoso sistémico hay una infiltración significativa de linfocitos B, sin embargo, estos no recapitulan el fenotipo de los linfocitos B de memoria residentes de tejido que se establecen durante infecciones respiratorias.

## REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., y Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology* (8th Edition). Elsevier Health Sciences. pp 3-7
- Al-Adhoubi, N. K., & Bystrom, J. (2020). Systemic lupus erythematosus and diffuse alveolar hemorrhage, etiology and novel treatment strategies. *Lupus*, 29(4), 355–363. <https://doi.org/10.1177/0961203320903798>
- Allie, S. R., Bradley, J. E., Mudunuru, U., Schultz, M. D., Graf, B. A., Lund, F. E., & Randall, T. D. (2019). The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nature Immunology*, 20(1), 97–108. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>
- Allie, S. R., & Randall, T. D. (2020). Resident memory B cells. *Viral Immunology*, 33(4), 282–293. <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0141>
- Anolik, J. H. (2013). B cell biology: implications for treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 22(4), 342–349. <https://doi.org/10.1177/0961203312471576>
- Barker, K. A., Etesami, N. S., Shenoy, A. T., Arafa, E. I., de Ana, C. L., Smith, N. M. S., Martin, I. M. C., Goltry, W. N., Barron, A. M. S., Browning, J. L., Kathuria, H., Belkina, A. C., Guillon, A., Zhong, X., Crossland, N. A., Jones, M. R., Quinton, L. J., & Mizgerd, J. P. (2021). Lung-resident memory B cells protect against bacterial pneumonia. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(11). <https://doi.org/10.1172/jci141810>

- Barker, K., Smith, N. M. S., Martin, I. M. C., Jones, M. R., Quinton, L. J., & Mizgerd, J. P. (2019). Pneumococcal exposures elicit resident memory B cells in the lung. D21. HOST RESPONSE TO LUNG INFECTIONS.
- Basta, F., Fasola, F., Triantafyllias, K., & Schwarting, A. (2020). Systemic lupus erythematosus (SLE) therapy: The old and the new. *Rheumatology and Therapy*, 7(3), 433–446. <https://doi.org/10.1007/s40744-020-00212-9>
- Batista, F. D., & Harwood, N. E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews. Immunology*, 9(1), 15–27. <https://doi.org/10.1038/nri2454>
- Billottet, C., Quemener, C., & Bikfalvi, A. (2013). CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836(2), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.08.002>
- Bonasia, C. G., Abdulahad, W. H., Rutgers, A., Heeringa, P., & Bos, N. A. (2021). B cell activation and escape of tolerance checkpoints: Recent insights from studying autoreactive B cells. *Cells (Basel, Switzerland)*, 10(5), 1190. <https://doi.org/10.3390/cells10051190>
- Bosello, S., Angelucci, C., Lama, G., Alivernini, S., Proietti, G., Toluoso, B., Sica, G., Gremese, E., & Ferraccioli, G. (2018). Characterization of inflammatory cell infiltrate of scleroderma skin: B cells and skin score progression. *Arthritis Research & Therapy*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1569-0>

- Cancro, M. P., & Tomayko, M. M. (2021). Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunological Reviews*, 303(1), 72–82. <https://doi.org/10.1111/imr.13016>
  
- Chen, C., & Laidlaw, B. J. (2022). Development and function of tissue-resident memory B cells. *Advances in Immunology*, 155, 1–38. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2022.08.001>
  
- Cho, A., Bradley, B., Kauffman, R., Priyamvada, L., Kovalenkov, Y., Feldman, R., & Wrammert, J. (2017). Robust memory responses against influenza vaccination in pemphigus patients previously treated with rituximab. *JCI Insight*, 2(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93222>
  
- Chowdhary, V. R., Grande, J. P., Luthra, H. S., & David, C. S. (2007). Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane-induced lupus. *Rheumatology (Oxford, England)*, 46(9), 1405–1410. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem117>
  
- Collins, M., Ling, V., & Carreno, B. M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology*, 6(6), 223. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-6-223>
  
- Dhenni, R., & Phan, T. G. (2020). The geography of memory B cell reactivation in vaccine-induced immunity and in autoimmune disease relapses. *Immunological Reviews*, 296(1), 62–86. <https://doi.org/10.1111/imr.12862>

- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., & Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature Immunology*, 10(12), 1292–1299. <https://doi.org/10.1038/ni.1814>
  
- Dorfman, D. M., & Shahsafaie, A. (2002). CD69 expression correlates with expression of other markers of Th1 T cell differentiation in peripheral T cell lymphomas. *Human Pathology*, 33(3), 330–334. <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.32215>
  
- Dörner, T., & Furie, R. (2019). Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 393(10188), 2344–2358. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30546-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30546-X)
  
- Freitas, E. C., de Oliveira, M. S., & Monticelo, O. A. (2017). Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clinical Rheumatology*, 36(11), 2403–2414. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3811-6>
  
- Gaddi, E., Balbaryski, J., Cantisano, C., Barboni, G., Candi, M., Quiroz, H., & Giraudi, V. (2001). *COMPORTAMIENTO DE LA FORMA SOLUBLE DE L-SELECTINA EN NIÑOS INFECTADOS CON HIV*. [Medicinabuenosaires.com. https://medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol61-01/4/v61\\_n4\\_p413\\_416.pdf](https://doi.org/10.1007/s10067-017-3811-6)
  
- Gregoire, C., Spinelli, L., Villazala-Merino, S., Gil, L., Holgado, M. P., Moussa, M., Dong, C., Zarubica, A., Fallet, M., Navarro, J.-M., Malissen, B., Milpied, P., & Gaya, M. (2022). Viral infection engenders bona fide and bystander subsets of lung-resident memory B cells through a permissive mechanism. *Immunity*, 55(7), 1216-1233.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.06.002>

- Grossman, JM (2009). Artritis lúpica. Mejores prácticas e investigación. *Reumatología clínica*, 23 (4), 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2009.04.003>
  
- Gulinello, M., & Putterman, C. (2011). The MRL/lpr mouse strain as a model for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2011/207504>
  
- Häusler, D., Häusser-Kinzel, S., Feldmann, L., Torke, S., Lepennetier, G., Bernard, C. C. A., Zamvil, S. S., Brück, W., Lehmann-Horn, K., & Weber, M. S. (2018). Functional characterization of reappearing B cells after anti-CD20 treatment of CNS autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(39), 9773–9778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810470115>
  
- Jacobi, A. M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C., & Diamond, B. (2009). Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus. *PloS One*, 4(6), e5776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005776>
  
- Janko, C., Schorn, C., Grossmayer, G. E., Frey, B., Herrmann, M., Gaipf, U. S., & Munoz, L. E. (2008). Inflammatory clearance of apoptotic remnants in systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmunity Reviews*, 8(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.07.015>

- Leandro, M. J., Cambridge, G., Ehrenstein, M. R., & Edwards, J. C. W. (2006). Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(2), 613–620. <https://doi.org/10.1002/art.21617>
- Leiss, H., Niederreiter, B., Bandur, T., Schwarzecker, B., Blüml, S., Steiner, G., Ulrich, W., Smolen, J. S., & Stummvoll, G. H. (2013). Pristane-induced lupus as a model of human lupus arthritis: evolution of autoantibodies, internal organ and joint inflammation. *Lupus*, 22(8), 778–792. <https://doi.org/10.1177/0961203313492869>
- Looney, R. J., Anolik, J., & Sanz, I. (2006). New therapies for systemic lupus erythematosus: cellular targets. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 32(1), 201–215, xi. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2005.09.007>
- Mackay, L. K., Braun, A., Macleod, B. L., Collins, N., Tebartz, C., Bedoui, S., Carbone, F. R., & Gebhardt, T. (2015). Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *The Journal of Immunology*, 194(5), 2059–2063. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402256>
- MacLean, A. J., Richmond, N., Koneva, L., Attar, M., Medina, C. A. P., Thornton, E. E., Gomes, A. C., El-Turabi, A., Bachmann, M. F., Rijal, P., Tan, T. K., Townsend, A., Sansom, S. N., Bannard, O., & Arnon, T. I. (2022). Secondary influenza challenge triggers resident memory B cell migration and rapid relocation to boost antibody secretion at infected sites. *Immunity*, 55(4), 718-733.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.003>

- Mahajan, A., Herrmann, M., & Muñoz, L. E. (2016). Clearance deficiency and cell death pathways: A model for the pathogenesis of SLE. *Frontiers in immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00035>
- Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K. A., Barber, D. L., Kawamura, K. S., Fraser, K. A., Webby, R. J., Brinkmann, V., Butcher, E. C., Newell, K. A., & Ahmed, R. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(3), 553–564. <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>
- Masopust, D., & Soerens, A. G. (2019). Tissue-resident T cells and other resident leukocytes. *Annual Review of Immunology*, 37(1), 521–546. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053214>
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., & Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5512), 2413–2417. <https://doi.org/10.1126/science.1058867>
- Meffre, E., & Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(6), 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.09.001>
- Metry, A. M., Al Salmi, I., Al Balushi, F., Yousef, M. A., Al Ismaili, F., Hola, A., & Hannawi, S. (2019). Systemic Lupus Erythematosus: Symptoms and signs at initial

presentations. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 18(2), 142–150. <https://doi.org/10.2174/1871523018666181128161828>

- Monneaux, F., Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.-P., & Muller, S. (2001). Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Faslpr and (NZB × NZW)F1 lupus mice. *International Immunology*, 13(9), 1155–1163. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.9.1155>
- Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 137–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954>
- Newman, J., Rice, J. S., Wang, C., Harris, S. L., & Diamond, B. (2003). Identification of an antigen-specific B cell population. *Journal of Immunological Methods*, 272(1–2), 177–187. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00499-4](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00499-4)
- Oh, J. E., Song, E., Moriyama, M., Wong, P., Zhang, S., Jiang, R., Strohmeier, S., Kleinstein, S. H., Krammer, F., & Iwasaki, A. (2021). Intranasal priming induces local lung-resident B cell populations that secrete protective mucosal antiviral IgA. *Science Immunology*, 6(66), eabj5129. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj5129>
- Onodera, T., Takahashi, Y., Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., & Kobayashi, K. (2012). Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2485–2490.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1115369109>

- Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., & Morel, L. (2011). Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 271694.  
<https://doi.org/10.1155/2011/271694>
- Ramwadhoebe, T. H., van Baarsen, L. G. M., Boumans, M. J. H., Bruijnen, S. T. G., Safy, M., Berger, F. H., Semmelink, J. F., van der Laken, C. J., Gerlag, D. M., Thurlings, R. M., & Tak, P. P. (2019). Effect of rituximab treatment on T and B cell subsets in lymph node biopsies of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 58(6), 1075–1085. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key428>
- Reeves, W. H., Lee, P. Y., Weinstein, J. S., Satoh, M., & Lu, L. (2009). Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in Immunology*, 30(9), 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.06.003>
- Richard, M. L., & Gilkeson, G. (2018). Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Science & Medicine*, 5(1), e000199. <https://doi.org/10.1136/lupus-2016-000199>
- Sancho, D., Gómez, M., & Sánchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology*, 26(3), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>

- Satoh, M., & Reeves, W. H. (1994). Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(6), 2341–2346. <https://doi.org/10.1084/jem.180.6.2341>
  
- Satoh, M, Treadwell, E. L., & Reeves, W. H. (1995). Pristane induces high titers of anti-Su and autoantibodies in mice Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera. *Journal of Immunological Methods*, 182(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00022-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00022-3)
  
- Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
  
- Steinmetz, O. M., Velden, J., Kneissler, U., Marx, M., Klein, A., Helmchen, U., Stahl, R. A. K., & Panzer, U. (2008). Analysis and classification of B-cell infiltrates in lupus and ANCA-associated nephritis. *Kidney International*, 74(4), 448–457. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.191>
  
- Szabo, P. A., Miron, M., & Farber, D. L. (2019). Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Science Immunology*, 4(34), eaas9673. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673>
  
- Summers, S. A., Hoi, A., Steinmetz, O. M., O’Sullivan, K. M., Ooi, J. D., Odobasic, D., Akira, S., Kitching, A. R., & Holdsworth, S. R. (2010). TLR9 and TLR4 are required for

the development of autoimmunity and lupus nephritis in pristane nephropathy. *Journal of Autoimmunity*, 35(4), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.05.004>

- Tan, H.-X., Juno, J. A., Esterbauer, R., Kelly, H. G., Wragg, K. M., Konstandopoulos, P., Alcantara, S., Alvarado, C., Jones, R., Starkey, G., Wang, B. Z., Yoshino, O., Tiang, T., Grayson, M. L., Opdam, H., D’Costa, R., Vago, A., Austin Liver Transplant Perfusionist Group, Mackay, L. K., ... Wheatley, A. K. (2022). Lung-resident memory B cells established after pulmonary influenza infection display distinct transcriptional and phenotypic profiles. *Science Immunology*, 7(67), eabf5314. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf5314>
- Tomayko, M. M., Steinel, N. C., Anderson, S. M., & Shlomchik, M. J. (2010). Cutting edge: Hierarchy of maturity of Murine memory B cell subsets. *The Journal of Immunology*, 185(12), 7146–7150. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002163>
- Trouvin, A.-P., Jacquot, S., Grigioni, S., Curis, E., Dedreux, I., Roucheux, A., Boulard, H., Vittecoq, O., Le Loët, X., Boyer, O., & Goëb, V. (2015). Usefulness of monitoring of B cell depletion in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients in order to predict clinical relapse: a prospective observational study: Monitoring B cell in rituximab treatment. *Clinical and Experimental Immunology*, 180(1), 11–18. <https://doi.org/10.1111/cei.12481>
- Tse, G. H., Johnston, C. J. C., Kluth, D., Gray, M., Gray, D., Hughes, J., & Marson, L. P. (2015). Intrarenal B cell cytokines promote transplant fibrosis and tubular atrophy. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of*

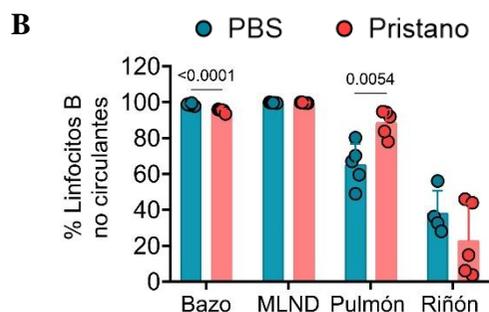
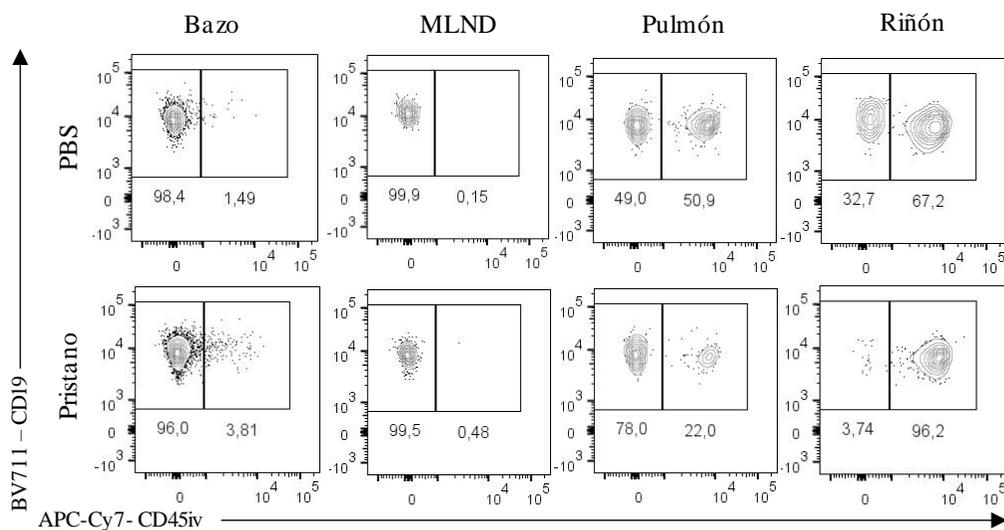
*Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 15(12), 3067–3080.  
<https://doi.org/10.1111/ajt.13393>

- Vital, E. M., Dass, S., Buch, M. H., Henshaw, K., Pease, C. T., Martin, M. F., Ponchel, F., Rawstron, A. C., & Emery, P. (2011). B cell biomarkers of rituximab responses in systemic lupus erythematosus: B Cell Biomarkers in Rituximab Therapy for SLE. *Arthritis and Rheumatism*, 63(10), 3038–3047. <https://doi.org/10.1002/art.30466>
- Wakim, L. M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5860), 198–202. <https://doi.org/10.1126/science.1151869>
- Wangriatisak, K., Thanadetsuntorn, C., Krittayapoositpot, T., Leepiyasakulchai, C., Suangtamai, T., Ngamjanyaporn, P., Khowawisetsut, L., Khaenam, P., Setthaudom, C., Pisitkun, P., & Chootong, P. (2021). The expansion of activated naive DNA autoreactive B cells and its association with disease activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Research & Therapy*, 23(1), 179
- Wardemann, H., & Nussenzweig, M. C. (2007). B-cell self-tolerance in humans. *Advances in Immunology*, 95, 83–110. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)95003-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)95003-8)
- Wellmann, U., Letz, M., Schneider, A., Amann, K., & Winkler, T. H. (2001). An Ig  $\mu$ -heavy chain transgene inhibits systemic lupus erythematosus immunopathology in autoimmune (NZB  $\times$  NZW)F1 mice. *International Immunology*, 13(12), 1461–1469. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.12.1461>

- Wooley, P. H., Seibold, J. R., Whalen, J. D., & Chapdelaine, J. M. (1989). Pristane-induced arthritis. the immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. *Arthritis and Rheumatism*, 32(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1002/anr.1780320812>
  
- Zuccarino-Catania, G. V., Sadanand, S., Weisel, F. J., Tomayko, M. M., Meng, H., Kleinstein, S. H., Good-Jacobson, K. L., & Shlomchik, M. J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nature Immunology*, 15(7), 631–637. <https://doi.org/10.1038/ni.2914>

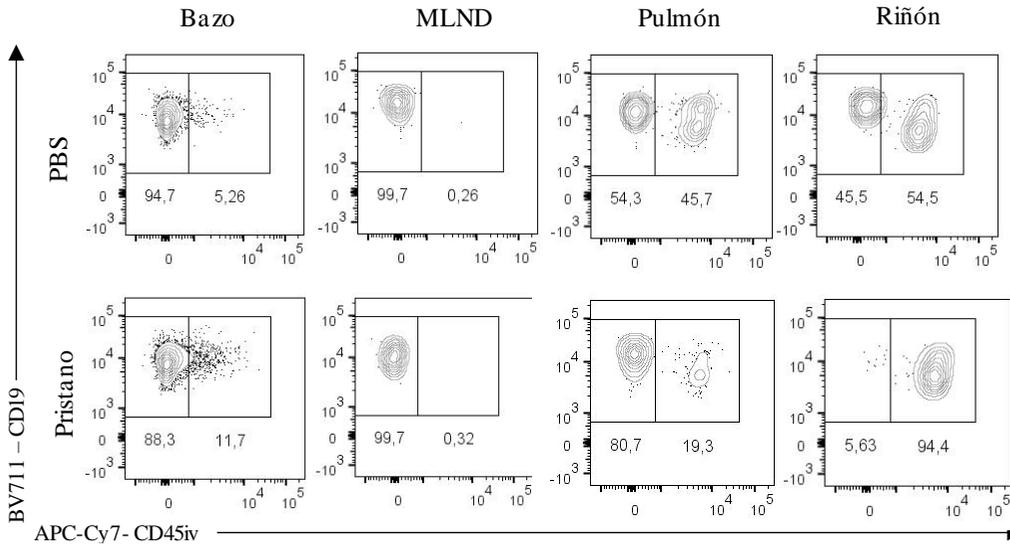
## MATERIAL COMPLEMENTARIO

### A Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>

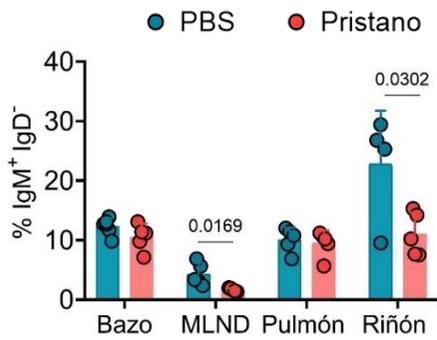


**Figura suplementaria 1. Aumento de la frecuencia de linfocitos B no circulantes totales en el pulmón de los ratones del modelo murino de LES.** (A-B) Gráficos de citometría de flujo representativos y las respectivas frecuencias tanto de los linfocitos B no circulantes totales (CD45iv<sup>-</sup>) de los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5), como de los linfocitos B no circulantes del grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). Cada ratón es representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia.

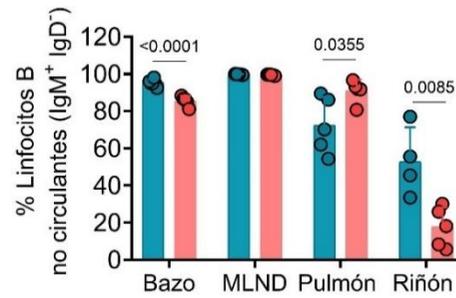
**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



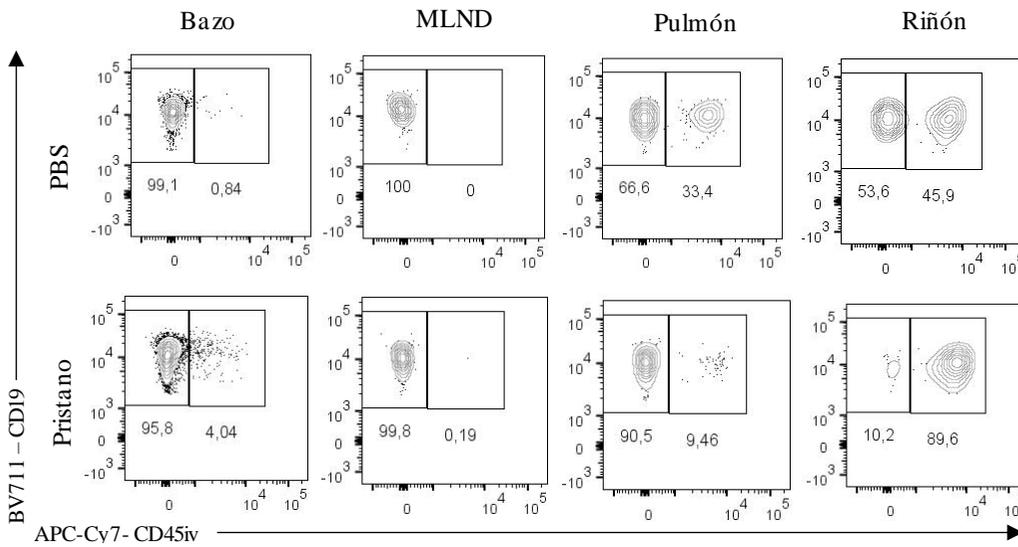
**B**

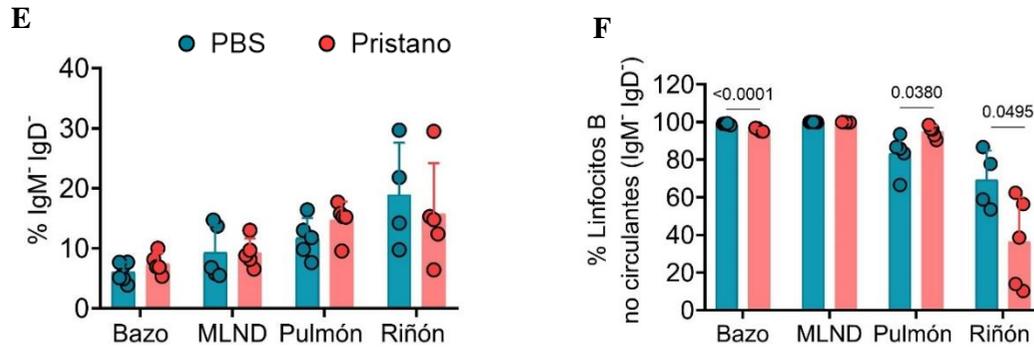


**C**

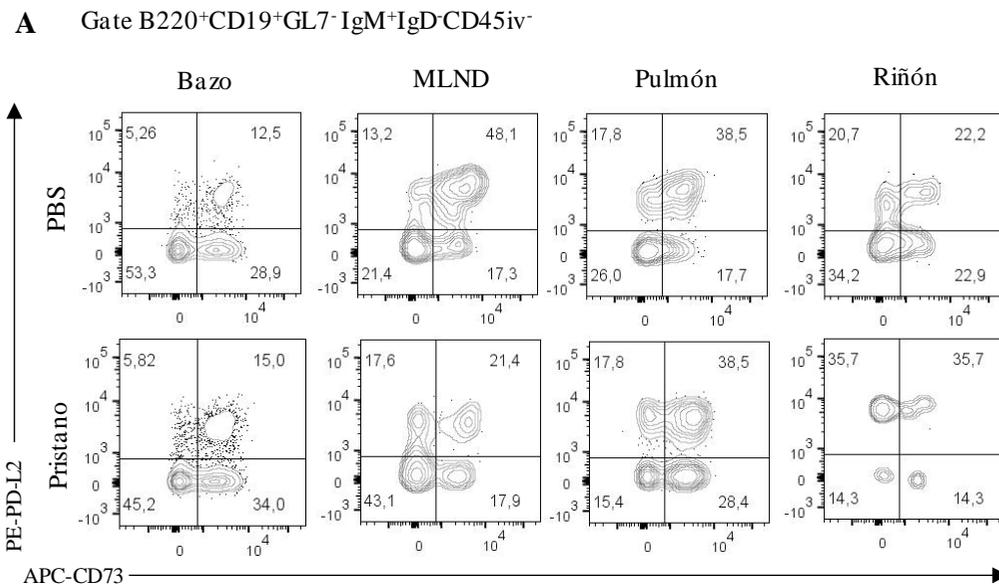


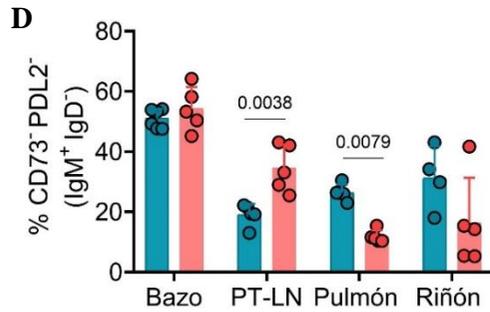
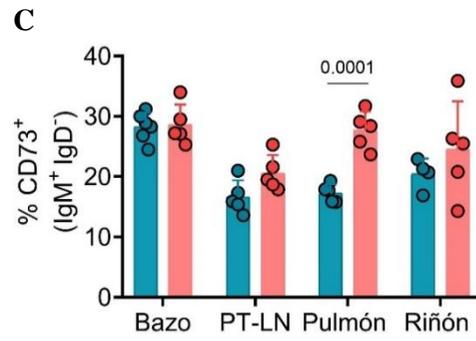
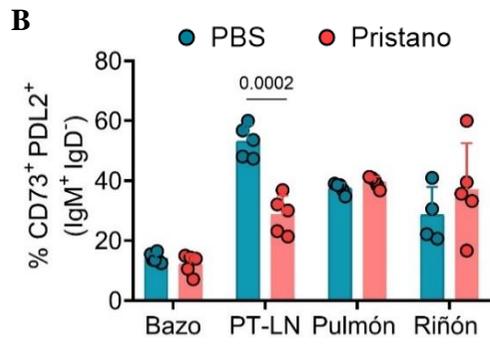
**D** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



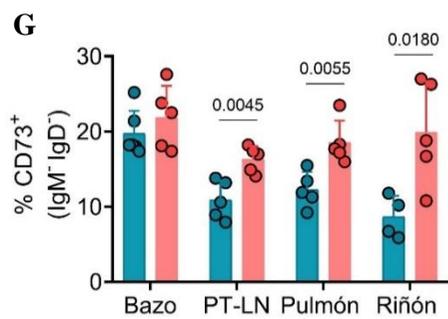
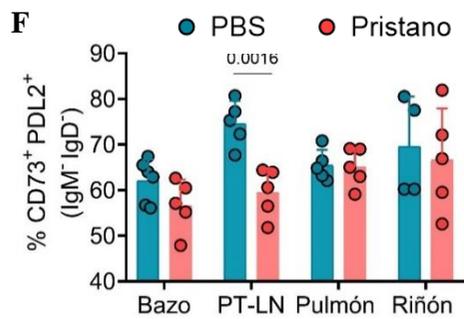
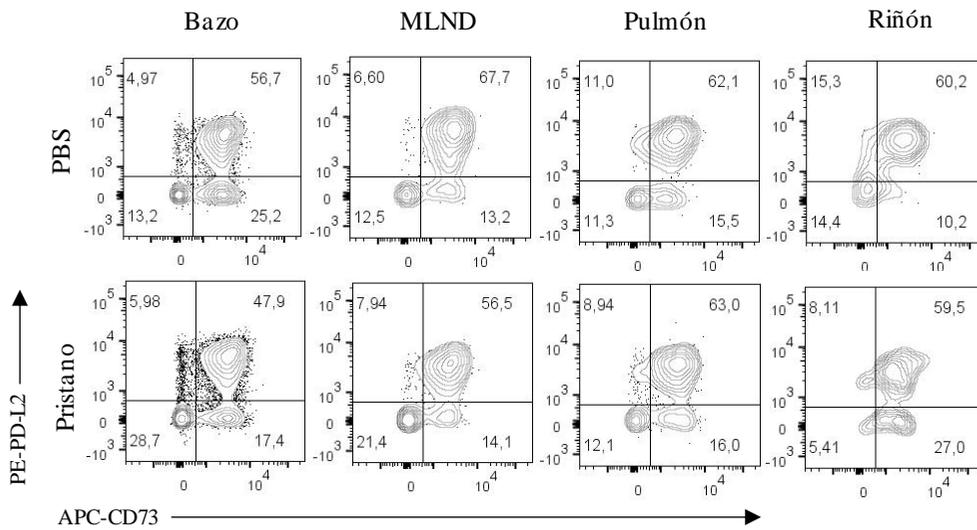


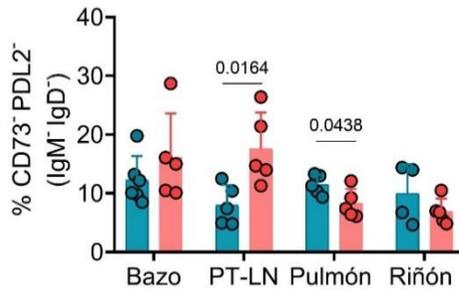
**Figura suplementaria 2. El modelo de LES inducido por pristano presenta una mayor frecuencia de linfocitos B de memoria no circulantes en el pulmón.** (A-C) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes (CD45iv<sup>-</sup>) de los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5), como de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes del grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). (B) Gráfico de frecuencia de linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>. (D-F) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes (CD45iv<sup>-</sup>) de los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5), como de los linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes del grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). (B) Gráfico de frecuencia de linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>. Cada ratón es representado por un punto, rojos para los ratones inyectados con pristano (LES) y azul para los ratones inyectados con PBS (controles). Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia.



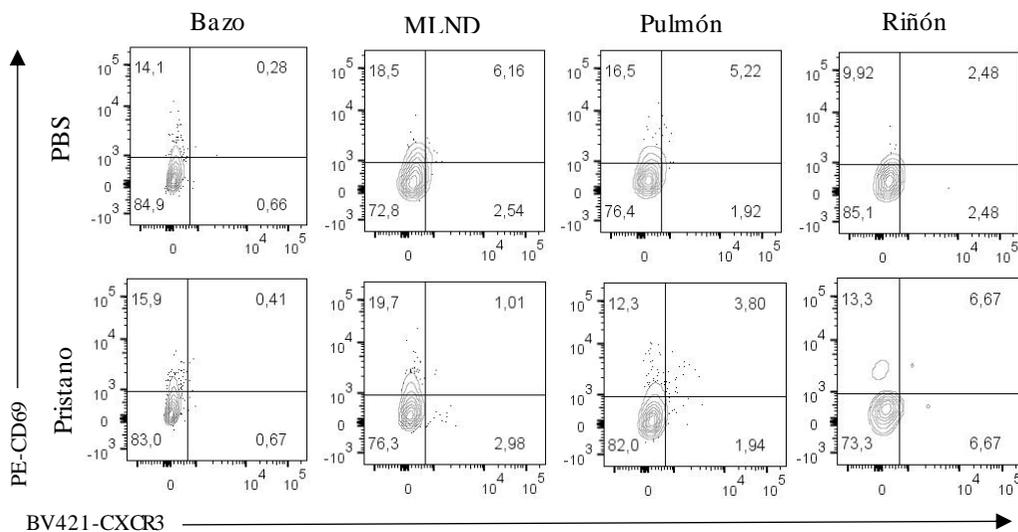


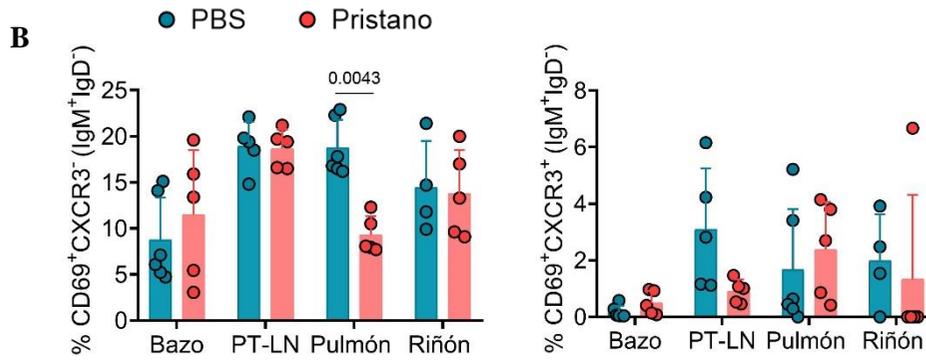
**E** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>CD45<sup>iv</sup>-



**H**

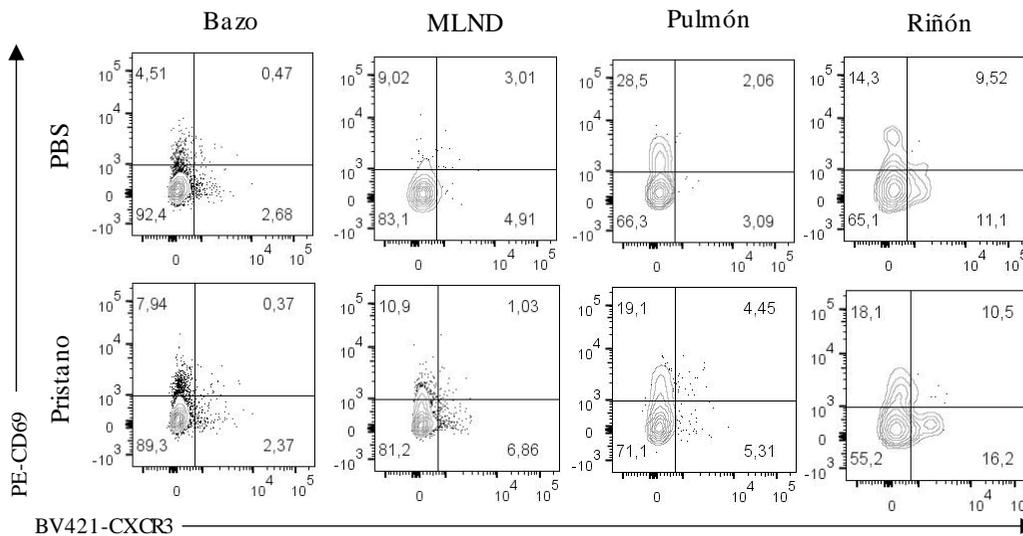
**Figura suplementaria 3. Los linfocitos B de memoria no circulantes presentes en el pulmón y en los ganglios mediastinales de los ratones enfermos tienden a reingresar en la reacción de centro germinal.** (A, B, C, D) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes (CD45<sup>iv-</sup>) CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>+/+</sup>PD-L2<sup>-</sup> de los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5), como de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes del grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). (E, F, G, H) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes (CD45<sup>iv-</sup>) CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>+/+</sup>PD-L2<sup>-</sup> de los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5), como de los linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes del grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). Cada ratón es representado por un punto, rojos para los ratones inyectados con pristano (LES) y azul para los ratones inyectados con PBS (controles). Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia.

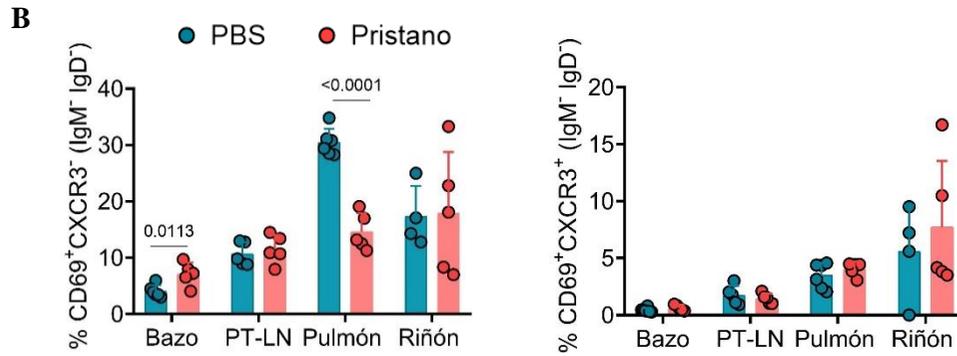
**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CD45<sup>iv-</sup>GL7<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>



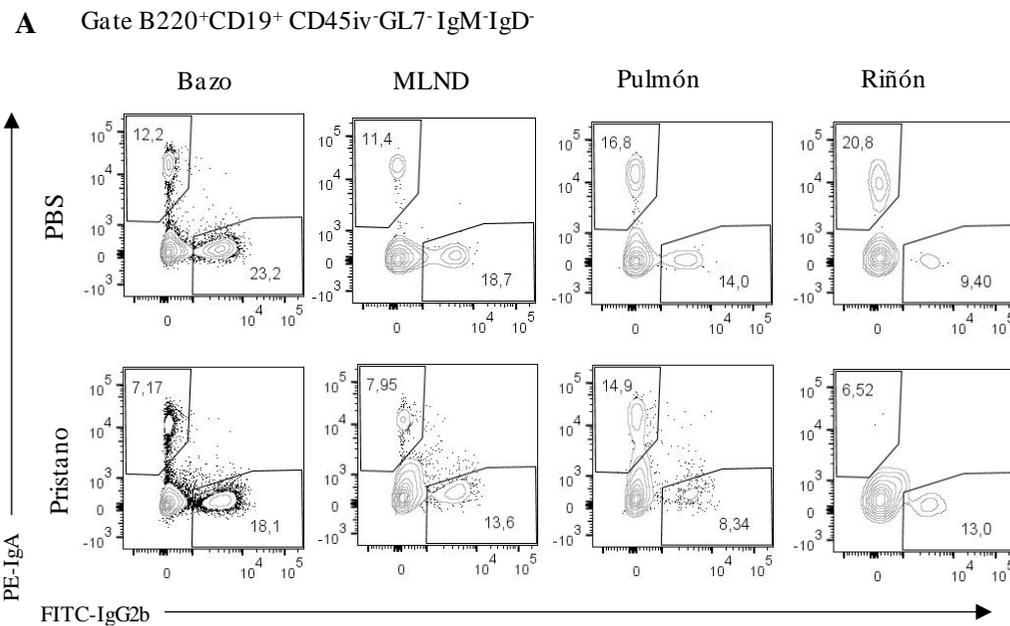
**Figura suplementaria 4. El pulmón de los ratones del modelo murino de LES presenta una disminución de los marcadores típicos de residencia de los linfocitos T de memoria residentes en los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>. (A, B) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes totales (CD45iv<sup>-</sup>) CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> de los ratones del modelo murino de LES como del grupo control en bazo, MLND, Pulmón y Riñón. Los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5); grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia.**

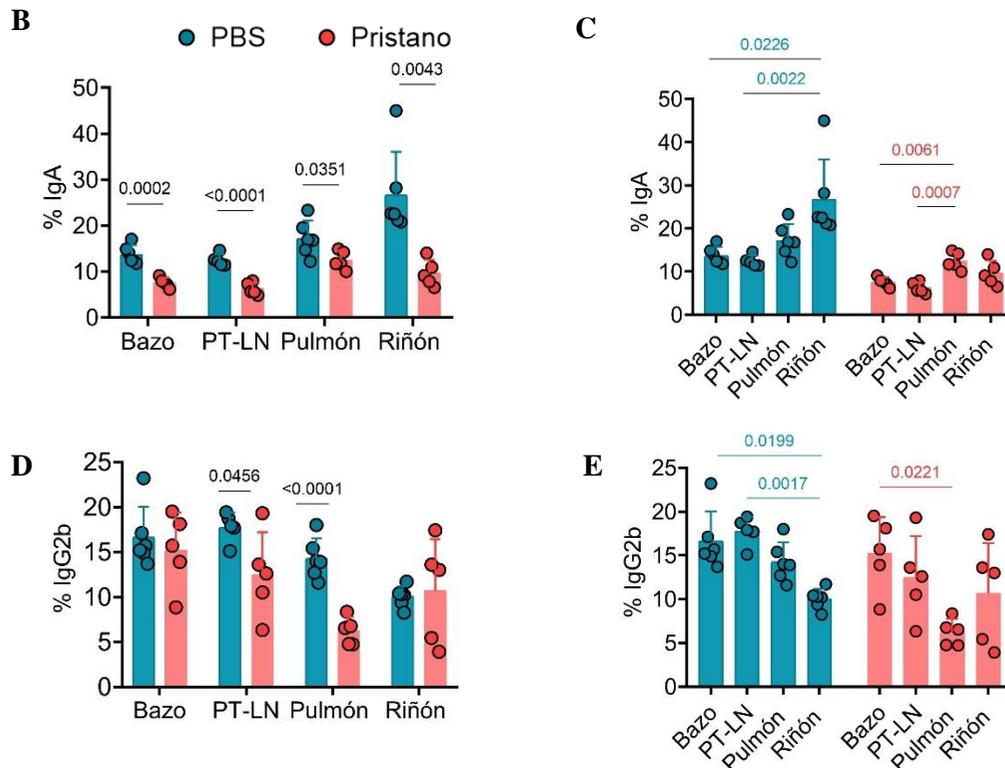
**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> CD45iv<sup>-</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>





**Figura suplementaria 5. El pulmón de los ratones del modelo murino de LES presenta una disminución de los marcadores típicos de residencia de los linfocitos T de memoria residentes en los linfocitos B de memoria con cambio de clase. (A, B) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> no circulantes totales (CD45<sup>iv-</sup>) CD69<sup>+</sup>CXCR3<sup>+/-</sup> de los ratones del modelo murino de LES como del grupo control en bazo, MLND, Pulmón y Riñón. Cada ratón es representado por un punto, rojos para los ratones inyectados con pristano (LES) y azul para los ratones inyectados con PBS (controles). Los ratones del modelo murino de LES en bazo (n=5), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=5); grupo control en bazo (n=6), MLND (n=5), Pulmón (n=5) y Riñón (n=4). Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia.**





**Figura suplementaria 6. En el modelo murino de LES hay una disminución de la frecuencia de IgA en todos los órganos.** (A-F) Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B de memoria  $IgM^+IgD^-$  no circulantes totales ( $CD45^{iv}$ ) de los ratones del modelo murino de LES en bazo ( $n=5$ ), MLND ( $n=5$ ), Pulmón ( $n=5$ ) y Riñón ( $n=5$ ), como de los linfocitos B de memoria  $IgM^+IgD^-$  no circulantes del grupo control en bazo ( $n=6$ ), MLND ( $n=5$ ), Pulmón ( $n=5$ ) y Riñón ( $n=6$ ). (E) Gráfico de frecuencia de linfocitos B de memoria  $IgM^+IgD^-$ . Cada ratón es representado por un punto, rojos para los ratones inyectados con pristano (LES) y azul para los ratones inyectados con PBS (controles). Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. MLND, ganglio mediastinal; %, frecuencia.