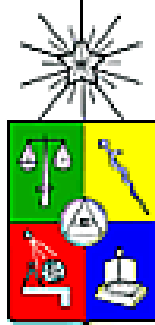


**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Estudio de la Interacción entre linfocitos B reguladores y monocitos a través del eje TIM-1/TIM-4 y PD-1/Ligandos de PD-1 como mecanismos de regulación inmune: implicancias en Artritis Reumatoide”**

**ASHLEY ANDRÉS FERRIER ESPÓSITO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Firma manuscrita en azul del Dr. Juan Carlos Aguillón.

**Dr. Juan Carlos Aguillón**

**Director**

Firma manuscrita en azul del Dr. Octavio Aravena.

**Dr. Octavio Aravena**

**Director**

Firma manuscrita en azul de Ashley Ferrier Espósito.

**Ashley Ferrier Espósito**

**Estudiante**

**2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato  
**ASHLEY ANDRÉS FERRIER ESPÓSITO**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de Septiembre de 2022.

**Prof. Dr. Juan Carlos Aguillón G.**

**Director de Tesis  
Dpto. Inmunología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile**

**Dr. Octavio Aravena M.**

**Director de Tesis  
Dpto. Inmunología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Rodrigo Naves**

**Presidente Comisión de Examen**

**Prof. Dra. Daniela Sauma**

**Prof. Dra. María Isabel Yussef**

**Prof. Dra. Mirentxu Iruretagoyena**

*A los que siempre están y no dejan de alentar*

## **Agradecimientos**

Son muchas las personas que han estado presentes en este proceso, sin contar las que han estado en alguna etapa desde el inicio de mi aventura en el Programa de Inmunología hace ya más de 10 años.

A mi familia, por apoyarme toda la vida, a pesar de no entender qué es lo que hago y porqué estaba en pandemia saliendo justo antes del toque de queda desde la U, también por cuidar de Dexter cuando me tocó ausentarme de Santiago o del país.

A mis tutores Dr. Aravena, (Alex) y Dr. Aguillón, por confiar en mi y en mi capacidades para llevar a cabo esta investigación, apoyarme siempre y ser comprensivos ante las dificultades durante el proceso.

A la comisión, por estar siempre dispuestos a participar en las etapas claves, por todos los consejos que me dieron para sacar el máximo de mis resultados y también por su comprensión en estos complejos últimos meses.

A la Dra. Soto, por hacer los esfuerzos para el reclutamiento de pacientes, a la enfermera Jenny y a la Juany, por ayudar con la toma de muestras; y a los pacientes y donantes sanos por querer formar parte de este estudio.

A los miembros y ex miembros del Laboratorio de Inmunoregulación y Tolerancia, en especial: a Andrés, con quien trabajé codo a codo antes y durante la pandemia; a la Eve por la buena onda y siempre tener sugerencias para aportar a la discusión; a la Nancy (la Eñora), por aguantarnos a todos, aunque la hagamos rabiar, y siempre tenernos PBS y puntas autoclavadas. Al Dr. Catalán por siempre estar dispuesto a participar de los ensayos y entregar feedback; a la Dra. Babs por sus consejos, y a la

Dra. Jaxi, por todo el apañe en todo ámbito, entramos juntos a este desafío y volvimos a ser compañeros, lo cual hizo más ameno todo el proceso.

A toda la gente del PDI que conocí en este tiempo, en especial: a los cabros de LC lab, Álvaro, Pablo, Cris y la Caro. A los de MCM lab, la Dra. Kar, Alphonse, Ale y Bastián; a la Dra. Cami Fuentes y a la Mari, que me bancó en Londres cuando era un homeless; y a todos y cada uno de los funcionarios del PDI.

A la Cecy, la segunda mamá de todos los estudiantes del Doctorado, por todo y más.

A los amigos de la vida, al grupo Bioteck (que solo la mitad es Bioteck), por todas las jornadas de esparcimiento necesarias para aliviar la carga académica, innumerables juntas, cumpleaños, matrimonios, Tesis, partidos del Anner, de pool y de D&D. Al grupo de las Dras. Pau (+Iván), Caro (+David), Maca y Glau, por todos estos años de buena onda, apañe, sobrinos putativos, juegos de mesa, pizzas y tortas. A la Sofi y a Janito por su amistad de incontables años y por siempre tener las palabras justas, y finalmente a Dexter que me acompaña desde el inicio de este viaje y aunque ensucie el departamento lo alegra con su energía y su colita.

.

## **Financiamiento**

- Beca ANID Doctorado Nacional 21181286
- Beca ANID Asistencia a Congreso Nacional e Internacional 81190446
- Beneficio ANID de Gastos Operacionales
- Proyecto FONDECYT N° 11170800



3.6.	Linfocitos B reguladores humanos y su rol en autoinmunidad.....	16
3.7.	Bregs en Artritis Reumatoide.....	17
3.8.	Interacción de Bregs con Monocitos.....	18
4.	Hipótesis .....	21
5.	Objetivo General .....	22
6.	Objetivos Específicos.....	22
7.	Metodología .....	23
7.1.	Reclutamiento y caracterización clínica de pacientes con AR.....	23
7.2.	Reclutamiento de Controles Sanos .....	24
7.3.	Extracción de linfocitos B, Monocitos y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con AR.....	24
7.4.	Extracción de linfocitos B, Monocitos y de células PBMC de controles sanos.....	25
7.5.	Inducción de Linfocitos B reguladores .....	26
7.6.	Caracterización fenotípica y funcional de los Linfocitos B reguladores Inducidos.....	26
7.6.1.	Evaluación de la secreción de IL-10: .....	26
7.6.2.	Cuantificación de niveles de mensajero mediante qPCR.....	27
7.6.3.	Determinación de la Expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo .....	28



7.6.4.	Capacidad Inhibitoria de los Linfocitos B reguladores.....	29
7.7.	Evaluación del efecto de iBregs sobre monocitos. ....	30
7.7.1.	Co-cultivos de Linfocitos B con Monocitos.....	30
7.7.2.	Detección de moléculas de superficie en Monocitos.....	31
7.7.3.	Secreción de IL-10 y TNF- $\alpha$ por Monocitos activados.....	31
7.7.4.	Expresión de IL-10 y TNF- $\alpha$ por Monocitos activados.....	31
7.8.	Determinación del rol de TIM-1 y PD-1 y sus Ligandos en la interacción de Linfocitos B y Monocitos.....	32
7.8.1.	Determinación de TIM-1 y GAPD mediante Western Blot.....	32
7.8.2.	Silenciamiento Génico de TIM-1 mediante magnetofección de si-RNA .....	32
7.8.3.	Co-cultivos de Monocitos con línea celular Huh 7.5 TIM-1 KD .....	33
7.8.4.	Bloqueo de PD-1 y PD-L1 en co-cultivos. ....	33
7.9.	Estudios realizados en muestras de pacientes.....	34
7.9.1.	Fenotipificación de Linfocitos B, iBregs y Monocitos.....	34
7.9.2.	Capacidad Inhibitoria de los Linfocitos B y iBregs sobre monocitos	34
7.10.	Análisis estadísticos. ....	34
8.	Resultados .....	36
	Objetivo Específico 1: Evaluar el efecto de los linfocitos B reguladores sobre la función de monocitos. ....	36

Objetivo Específico 2 Determinar el efecto regulador de las moléculas TIM-1 y PD-1 con sus ligandos, TIM-4 y PD-L1/PD-L2, respectivamente en la interacción de linfocitos B reguladores con monocitos.....	52
Objetivo Específico 3. Determinar alteraciones en la comunicación del eje TIM-1/TIM-4 y PD-1/PD-L1 y PD-L2 entre linfocitos B reguladores y monocitos de pacientes con Artritis Reumatoide.....	65
9. Discusión.....	75
10. Modelo propuesto.....	88
11. Conclusiones.....	90
12. Bibliografía.....	91
13. Anexos.....	103

## Índice de Figuras

Figura 1. Inmunofisiopatología de la AR.....	7
Figura 2 Expresión de TIM-4 en monocitos.....	19
Figura 3 Caracterización de linfocitos B reguladores inducidos (iBregs).....	37
Figura 4 Expresión de PD-1 y sus ligandos en Linfocitos B reguladores inducidos (iBregs).....	38
Figura 5. Inhibición de la respuesta efectoras en linfocitos T por iBregs.....	40
Figura 6. Esquema de estrategia experimental y análisis de datos.....	42
Figura 7. Estrategia de <i>gating</i> y <i>dot-plots</i> representativos.....	44
Figura 8. Efecto de los iBregs sobre la expresión de HLA-DR en monocitos.....	46
Figura 9. Efecto de los iBregs sobre la expresión de CD14, CD86 y TIM-4 en monocitos.....	47
Figura 10 Evaluación de la capacidad de los iBregs de alterar la función de los Monocitos mediante factores solubles.....	50
Figura 11. Evaluación de la capacidad de los iBregs de alterar la función de los Monocitos en cultivos convencionales.....	51
Figura 12. Expresión de TIM-1 en Huh 7.5, linfocitos B e iBregs detectada mediante Western Blot.....	55
Figura 13. Silenciamiento de GAPD en Huh 7.5.....	57
Figura 14. Silenciamiento de TIM-1 en Huh 7.5.....	58
Figura 15. Silenciamiento de GAPD en linfocitos B.....	61
Figura 16. Efecto de Huh 7.5 TIM-1 KD sobre monocitos.....	62

Figura 17. Efecto del bloqueo del eje PD-1/PD-L1 en la inhibición de HLA-DR en monocitos mediada por iBregs.....	64
Figura 18. Caracterización de linfocitos B y monocitos en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide y de controles sano.....	67
Figura 19. Comparación de la capacidad de linfocitos B de alterar el fenotipo de los monocitos de pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.....	68
Figura 20. Comparación de la capacidad de los iBregs de alterar el fenotipo de monocitos de pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.....	68
Figura 21. Alteraciones en la frecuencia de linfocitos B TIM-1 <sup>+</sup> y monocitos TIM-4 <sup>+</sup> en pacientes con artritis reumatoide.....	72
Figura 22. Alteraciones en la frecuencia de linfocitos B PD-1 <sup>+</sup> , PD-L1 <sup>+</sup> y PD-L2 <sup>+</sup> en pacientes con artritis reumatoide.....	73
Figura 23 Modelo de los mecanismos de regulación ejercidos por los Bregs sobre los monocitos en Artritis Reumatoide y en el restablecimiento de la tolerancia.....	88
Figura 24. Efecto del anticuerpo antagonista de TIM-1 en co-cultivos.....	103

## Índice de Tablas

Tabla 1 Lista de Partidores utilizados.....	28
Tabla 2. Resumen de los datos de los pacientes con Artritis Reumatoide reclutados .....	66

## Abreviaturas

<b>Anti-CCP</b>	Anticuerpos Anti-proteínas Citrulinadas
<b>APC</b>	del inglés “Allophycocyanin”
<b>APCs</b>	Células presentadoras de Antígenos
<b>APRIL</b>	Ligando Inductor de la proliferación
<b>AR</b>	Artritis Reumatoide
<b>BAFF</b>	Factor activador de linfocitos B
<b>BCR</b>	Receptor de células B
<b>Bregs</b>	Linfocitos B reguladores
<b>BV</b>	Violeta brillante
<b>CCL2</b>	Quimioquina Ligando 2 de motivo C-C
<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno.
<b>CFSE</b>	del inglés “Carboxyfluorescein succinimidyl ester”
<b>CXCL</b>	Quimioquina Ligando de motivo C-X-C
<b>DAS28</b>	Puntuación de Actividad de la Enfermedad en 28 Articulaciones
<b>DCs</b>	Células Dendríticas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis autoinmune experimental
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
<b>ES</b>	Esclerosis Sistémica
<b>FACS</b>	Inglés para “Fluorescence-activated cell sorting”
<b>Fc</b>	Fracción Cristalizable

<b>FcR</b>	Receptor de Fc
<b>FITC</b>	Inglés para “Fluorescein isothiocyanate”
<b>FLS</b>	Fibroblastos Sinoviales
<b>FSC</b>	del inglés “Forward scatter”
<b>FVD</b>	Tinte de viabilidad fijable
<b>GAPD</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rábano
<b>IFN</b>	Interferón.
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>ITAM</b>	Motivo de Inmunoreceptor Activador basado en tirosina
<b>ITIM</b>	Motivo de Inmunoreceptor Inhibitorio basado en tirosina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>KD</b>	del inglés “Knock Down”
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MFI</b>	Media de Intensidad de fluorescencia
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa
<b>PD-1</b>	Proteína de Muerte Programada 1
<b>PD-L1</b>	Ligando de Muerte Programada 1
<b>PE</b>	Inglés para “Phycoerythrin”
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato 13-acetato
<b>qPCR</b>	Reaccion en cadena de polimerasa cuantitativa
<b>rh</b>	Proteína humana recombinante
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>siRNA</b>	Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia
<b>SLE</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>SSC</b>	Inglés para “Side scatter”
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TBS</b>	Tampón Tris Salino
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta.
<b>Tfh</b>	Linfocitos T “helper” folicular
<b>Th</b>	Linfocito T “helper”
<b>TIM</b>	Dominio de Inmunoglobulina y Mucina de Linfocitos T
<b>TLR</b>	Receptor de tipo “Toll”
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Tregs</b>	Linfocitos T reguladores



<b>Tr1</b>	Linfocitos T reguladores tipo 1
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>WB</b>	del inglés “Western Blot”

## 1. Resumen

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune crónica en cuya inmunopatogenia los monocitos cumplen un rol fundamental en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad, siendo un potencial blanco de estudio para su regulación. Los linfocitos B reguladores (Bregs), una subpoblación de células capaces de modular respuestas inflamatorias que favorecen la homeostasis inmune, presentan diversos mecanismos reguladores, siendo la secreción de interleuquina-10 el principal de ellos. La función de los Bregs sobre linfocitos T ha sido ampliamente descrita, pero **poco se conoce de la modulación sobre otras células del sistema inmune como los monocitos**. Por otro lado, el receptor TIM-1, cuyos ligandos celulares son TIM-1 y TIM-4, ha sido descrito como un marcador de Bregs y como molécula crítica en su función. Junto con ello, también se ha demostrado la importancia de PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PDL-2 en dicha función. A la fecha, se han descrito diversas alteraciones en la frecuencia y en la funcionalidad de los Bregs en autoinmunidad, **pero poco se conoce de la participación de TIM-1, PD-1 y sus ligandos en estas alteraciones**. En base a esta evidencia, nosotros proponemos que **linfocitos B reguladores de pacientes con AR presentan una capacidad reducida para regular la función de monocitos a través del eje TIM-1/TIM-4 y del eje PD-1/Ligandos de PD-1 en comparación a controles sanos**. En este trabajo demostramos que los linfocitos B reguladores son capaces de modular la función de monocitos tanto por factores solubles como por interacciones célula a célula, en donde PD-L1 cumple un rol fundamental y TIM-1 podría tener un papel similar. Finalmente, demostramos que los Bregs de pacientes con AR presentan una menor capacidad reguladora sobre los monocitos y esto puede ser debido a que presentan una menor frecuencia de linfocitos B TIM-1 en sangre periférica y menor capacidad de respuesta a su inducción. Estas alteraciones contribuirían a la pérdida de tolerancia subyacente a esta enfermedad, permitiendo que los monocitos retroalimenten positivamente el ciclo inflamatorio en la AR. Con este trabajo contribuimos con nuevos antecedentes en los mecanismos ejercidos por las Bregs sobre los monocitos, estando estos alterados en AR, estableciendo nuevos blancos para una potencial terapia tolerizante.

## 2. Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune systemic disease in whose immunopathogenesis monocytes play a fundamental role in the development and perpetuation of the disease, being a potential target of study for its regulation. In this line, regulatory B cells (Bregs), a subpopulation of cells capable of modulating inflammatory responses that favor immune homeostasis, present various regulatory mechanisms, the main one being interleukin-10 secretion. The function of Bregs on T cells has been widely described, but little is known about the modulation on other cells of the immune system such as monocytes. On the other hand, the TIM-1 receptor, whose cellular ligands are TIM-1 and TIM-4, has been described as a Bregs marker and as a critical molecule in its function. Along with this, the importance of PD-1 and its ligands PD-L1 and PDL-2 in said function has also been demonstrated. To date, various alterations in the frequency and functionality of Bregs in autoimmunity have been described, but little is known about the participation of TIM-1, PD-1 and their ligands in these alterations. Based on this evidence, we propose that regulatory B cells from RA patients have a reduced ability to regulate monocyte function through the TIM-1/TIM-4 axis and the PD-1/PD-1 Ligand axis in comparison to healthy controls. In this work, we demonstrate that regulatory B cells are capable of modulating monocyte function both by soluble factors and by cell-to-cell interactions, where PD-L1 plays a fundamental role and TIM-1 could have a similar role. Finally, we show that Bregs from patients with RA have a lower regulatory capacity on monocytes and this may be due to the fact that they have a lower frequency of TIM-1 B cells in peripheral blood and a lower capacity to respond to their induction. These alterations would contribute to the loss of tolerance underlying this disease, allowing monocytes to positively feedback the inflammatory loop in RA. With this work we contribute with new information on the mechanisms exerted by Bregs on monocytes, these being altered in RA, establishing new targets for a potential tolerizing therapy.

### 3. Introducción

#### 3.1. Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune crónica caracterizada por una inflamación del tejido sinovial, que conduce a una destrucción progresiva del cartílago y hueso articular (1), es una enfermedad invalidante e incurable, que afecta la calidad y la expectativa de vida quienes la padecen. A nivel mundial presenta una prevalencia de 0,1 a 2,0%, mientras que en Chile está estimada en un 0,46% (2)

##### 3.1.1. Factores de riesgo para el desarrollo de la AR

Varios factores genéticos y ambientales se han asociado con un aumento riesgo de artritis reumatoide (AR). Entre estos, las asociaciones más fuertes se tienen identificado el género, la susceptibilidad genética, exposición a factores externos ambientales y composición de la mucosa-microbiota. Entre las asociaciones genéticas más relevantes se encuentra el antígeno leucocitario humano gen (HLA)-DR, en particular HLA-DRB1 (3). Esta asociación ha sugerido un rol para las células presentadoras de antígenos (APC) que comandan la selección del repertorio de células T, así como su hiperactivación en la patogenia de la AR, por ejemplo, aumentando la presentación de péptidos alterados incluyendo proteínas citrulinadas, consideradas factor de riesgo en esta enfermedad (4).

Varios factores ambientales, incluidos el tabaquismo, la dieta y otros factores relacionados con el estilo de vida se han asociado a la AR (5). Uno de los problemas ambientales mejor documentados como factores de riesgo para la AR es la exposición

al tabaco. Varios estudios han identificado una asociación consistente con AR e informó que fumar puede conducir a un aumento 2 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad (6). Se cree que fumar induce estrés de tejido en la mucosa pulmonar que conduce a un aumento en las modificaciones postraduccionales de péptidos, incluida la citrulinación, y en consecuencia la generación de anticuerpos contra proteínas citrulinadas (anti-CCP) (7). Además de los anticuerpos anti-CCP, el autoanticuerpo RF está presente en un estimado 80% de los pacientes con AR (8). Es interesante señalar que estos anticuerpos se dirigen a proteínas que se distribuyen a lo largo todo el cuerpo y no son específicos de las articulaciones, y no está claro exactamente cómo la pérdida sistémica de tolerancia conduce a la artritis dentro de las articulaciones.

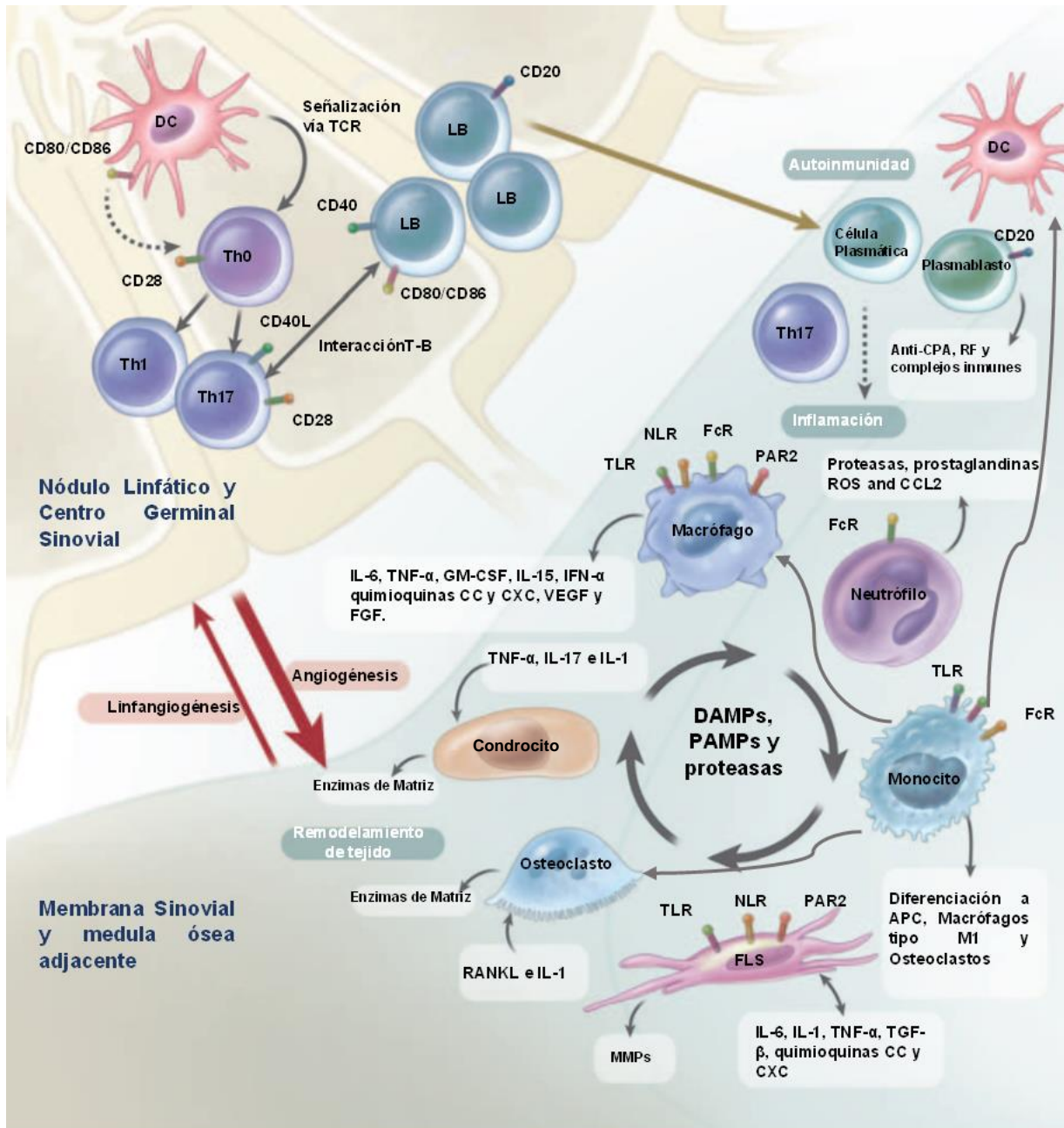
### 3.1.2. Inmunopatología de la AR

Se estima que los componentes genéticos como ambientales señalados son los posibles causantes del quiebre en la tolerancia inmune, estos componentes provocarían la alteración de la regulación postranscripcional de proteínas propias. Estas proteínas alteradas son posteriormente reconocidas por linfocitos T y B autorreactivos que han escapado de los mecanismos de tolerancia central y periférica, y por lo tanto se produce la ruptura en la tolerancia y conduciendo a la producción de autoanticuerpos por células plasmáticas (9). Estudios han demostrado que los autoanticuerpos, producidos por los linfocitos B autorreactivos, están presentes antes del inicio de la inflamación articular, lo que sugiere que la ruptura de la tolerancia y la activación de las respuestas inmunitarias que conducen al desarrollo de la AR ocurren mucho antes del inicio de los síntomas clínicos (10).

Este desarrollo de autoantígenos y la ruptura de la tolerancia inmunológica conduce a la activación de células residentes dentro de la articulación y posteriormente una cascada de eventos inmunes inflamatorios y el desarrollo de sinovitis, daño del cartílago y destrucción ósea. La sinovitis, corresponde al engrosamiento del revestimiento sinovial, infiltración de células inmunitarias innatas y adaptativas, incluidos los monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC), células asesinas naturales (NK), linfocitos B, linfocitos T y células plasmáticas; la neovascularización y la linfangiogenesis. Este reclutamiento de células a la articulación alimenta la inflamación local, creando una retroalimentación positiva (11). (Fig. 1).

El reclutamiento de células innatas, en particular de neutrófilos, caracteriza la etapa temprana de la AR. Los neutrófilos residentes en las articulaciones secretan proteasas, prostaglandinas e intermedios reactivos del oxígeno, que contribuyen al daño tisular dentro de este órgano (12). Los neutrófilos también secretan quimiocinas CCL2 y CXCL8, responsables de reclutamiento adicional de monocitos y neutrófilos respectivamente (13).

Macrófagos residentes y derivados de monocitos reclutados por neutrófilos en el sinovio produce varias citoquinas, incluidas TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (14). TNF $\alpha$  y IL-1 impulsa la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, y la regulación positiva de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares y fibroblastos sinoviales (FLS) dentro del sinovio que conduce a un mayor reclutamiento y retención de leucocitos circulantes (15). IL-6 es un factor de crecimiento y promueve la célula B diferenciación y producción de autoanticuerpos (16). Además, DC residentes de la articulación, contribuyen a la inflamación local y al reclutamiento de leucocitos a través de la producción de citoquinas y también presentan autoantígenos a los linfocitos T autorreactivos (17).



**Figura 1. Inmunofisiopatología de la AR.** Las interacciones dependientes de la co-estimulación entre las células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B ocurren principalmente en el ganglio linfático; estos eventos generan una respuesta autoinmune a las proteínas propias que contienen citrulina. En la membrana sinovial y la médula ósea adyacente, las vías inmunitarias innatas y adaptativas se integran



para promover la remodelación y el daño de los tejidos. Los bucles de retroalimentación positiva mediados por las interacciones mostradas entre leucocitos, monocitos, fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoclastos, junto con los productos moleculares del daño, impulsan la fase crónica en la patogenia de la artritis reumatoide. DAMP Patrón molecular asociado a daño Dkk-1 dickkopf-1, FcR receptor FC, FGF factor de crecimiento de fibroblastos, GM-CSF Factor Estimulador de colonias de Granulocitos y Macrófagos, IFN- $\alpha$  Interferón- $\alpha$ , MMP metaloproteinasas de Matriz,, PAMP Patrón molecular asociado a patógeno, PAR2 receptor 2 activado por proteasa, RANKL Ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B, TGF- $\beta$  factor  $\beta$  transformador de crecimiento, Th0 Linfocito T helper tipo 0, Th1 Linfocito T helper tipo 1, Th17 Linfocito T helper tipo 17, TLR receptor tipo Toll, TNF- $\alpha$  Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , and VEGF facto de crecimiento vascular-endotelial. Modificada de McInnes 2011 (12).

La diferenciación de los linfocitos T autorreactivos juega un papel importante en la conducción de la AR, formando parte de la respuesta inmune adaptativa que comanda la enfermedad (18). Una vez reclutadas a la articulación, estos linfocitos T en respuesta al autoantígeno presentado por las DC, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, se diferenciarán en T helper 1 (Th1) y células T helper 17 (Th17), que producen IFN- $\gamma$  e IL-17 respectivamente y contribuir a la inflamación y al daño tisular (19). En particular, se ha demostrado que la IL-17 producida por los Th17 activa a los fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoclastos, lo que resulta en la degradación del cartílago y la erosión ósea (20). Más aún, se ha reportado que existe un bajo o nulo reclutamiento de linfocitos T reguladores (Tregs), células relevantes en la mantención de la tolerancia (21).

Los linfocitos B contribuyen a la patogenia de la AR a través de la presentación de antígenos, producción de autoanticuerpos y secreción de citoquinas proinflamatorias (22,23). Los autoanticuerpos impulsan la erosión ósea y osteoclastogénesis; Los pacientes anti-CCP positivos tienen erosiones más profundas que los pacientes con AR anti-CCP negativos (24). La formación de complejos inmunes por autoanticuerpos impulsa la sinovitis a través de la activación de macrófagos, y aumenta la osteoclastogénesis mediante la activación de los osteoclastos a través de la unión de receptores Fc (25). La supervivencia de los linfocitos B se mantiene gracias a las abundantes cantidades de BAFF, APRIL e IL-6 producidos por FLS residente conjunto, macrófagos y células estromales, linfocitos infiltrados, monocitos y células dendríticas (26,27). Más recientemente, se ha descrito una función reguladora ejercida por los linfocitos B a través de la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, TGF- $\beta$  o la

expresión de moléculas con funciones supresoras, entra otras, (células B reguladoras, Bregs) (28). El rol de linfocitos B reguladores en autoinmunidad y en particular en AR se detallará más adelante.

Una de las células infiltrantes al sinovio con un importante rol en el inicio, mantención y con gran actividad en la inflamación sinovial son los Monocitos. Estos son principalmente quimioatraídos mediante CCL2 (MCP-1) y CXCL3 (fractalquina) secretadas por los FSL reclutándolos al sinovio.(29) Estos monocitos activados aumentan su expresión de moléculas antigénica y de adhesión y entran en un círculo de cooperación con otras células del microambiente favoreciendo la propagación de la AR. Monocitos intermedios (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup>), que se encuentran aumentados en sangre periférica de pacientes con AR, pueden madurar finalmente a macrófagos tipo M1 críticos en la inflamación del sinovio o a adoptar características de APC (30)(31). Finalmente los monocitos clásicos (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>) son capaces de diferenciarse a osteoclastos mediante RANKL, células responsables de la erosión en las articulaciones en AR(32). Debido al amplio alcance de los monocitos en la inmunopatología de la AR, es importante estudiar que mecanismos regulatorios podrían modular su respuesta y si estos se encuentran alterados, como se mencionó anteriormente los linfocitos B pueden cumplir un papel regulador y debido a los diversos mecanismos que poseen para ejercer su función, han sido un importante blanco de investigación en los últimos años.

### **3.2. Linfocitos B reguladores**

Como bien se indicó, a lo largo de los años se le ha asociado un rol inmunoregulador a los linfocitos B, esta idea surgió cuando se observó que ratones deficientes en linfocitos B son incapaces de recuperarse de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)(33). Estudios posteriores demostraron que esta capacidad reside en una población de linfocitos B secretores de IL-10, que generaban protección en algunas enfermedades autoinmunes, tales como; EAE, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis inducida por colágeno (CIA) (34,35). Dada esta característica en la actualidad estas células son llamadas linfocitos B reguladores o Bregs.

Se ha demostrado que la IL-10 derivada de Bregs inhiben la generación de respuestas del tipo Th1 y Th17 en modelos de EAE (36), y respuesta Th1 en CIA (35), a través de la supresión de la IL-6 e IL-12 secretada por las células dendríticas (37). También, se ha demostrado que las Bregs participan en la generación de linfocitos T reguladores Foxp3+, en donde la secreción de interleuquina (IL)-10 y la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 son necesarias para este fenómeno (38). Más recientemente, se demostró que ratones con CIA carentes de Bregs desarrollaban una enfermedad más exacerbada con un incremento de las poblaciones Th1 y Th17 y una disminución en la población T reguladora. (39).

### **3.3. Identificación de Bregs y sus mecanismos de regulación**

#### **3.3.1. Marcadores moleculares de Bregs**

Dado que se han descrito varios subtipos de células B con capacidades reguladoras, el principal problema para estudio de los Bregs reside en la falta de un marcador único

que las identifique del resto, aunque inicialmente la mayoría de los estudios que describieron los linfocitos B con propiedades reguladoras se realizaron con linfocitos B tipo B-2 (35), aunque también existen reportes que le ha conferido actividad reguladora a linfocitos B tipo B-1(40). Una de las primeras poblaciones secretoras de IL-10 estudiadas son los precursores murinos de linfocitos B de la zona marginal T2 (T2-MZP Bregs), estudios *in vivo* muestran que estas células co-expresan una serie de marcadores incluyendo IgM, IgD, CD19, CD21, CD23, CD24 y CD93, suprimen el desarrollo de CIA y atenúan la severidad de lupus espontáneo (41,42). Por otro lado, se ha descrito una población de linfocitos B productores de IL-10 con capacidades supresoras identificada como células CD19+CD5+CD1d+ (43), atribuyendo roles similares a células CD19+CD5+Foxp3+ (44). En humanos, linfocitos B secretoras de IL-10 se encuentran en una frecuencia de 0.6 al 5.0% del total de las células mononucleares (PBMC) de sangre periférica (45), y están principalmente contenidas en la subpoblación de los linfocitos B transicionales, identificadas como células CD19+CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>, de ahí que esta combinación de marcadores sea la más utilizada en células humanas.

### 3.3.2. Mecanismos reguladores IL-10 independientes mediados por Bregs

Uno de los mecanismos principales por los cuales los linfocitos B mantienen la homeostasis inmune es mediante la secreción de IL-10, y como se mencionó anteriormente, los define como subpoblación de Bregs. Sin embargo, en los últimos 5 años, diversos mecanismos alternativos asoman como nuevos blancos de investigación para comprender cabalmente la función reguladora de los linfocitos B.

La secreción de TGF- $\beta$  por Bregs, citoquina antiinflamatoria que ha sido descrita como un factor relevante en la inducción de linfocitos T reguladores (Tregs) Foxp3 (naturales) , y en conjunto con indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), de linfocitos T reguladores tipo 1 (Tr1; inducibles) y linfocitos T productores de TGF- $\beta$  (Th3) (46). Por otro lado, la expansión de Bregs mediante IL-21, genera una población de linfocitos B secretora de IL-10, secretoras de IDO y Granzima-B (GrB), los cuales limitarían la proliferación de linfocitos T mediante la degradación de la cadena  $\zeta$  del receptor de células T en un mecanismo GrB dependiente.(47). En este trabajo también se describió esta población de Bregs como CD25+, evento observado anteriormente por el grupo de Lorenz en linfocitos B activados (48), los cuales utilizan como mecanismo de inhibición dependiente de IL-2 por los linfocitos B, principal mecanismo de inhibición descrito en células Tregs (49).

### **3.4. El eje PD-1/PD-L1 como mecanismo supresor empleado por Bregs**

PD-1 es un receptor de membrana tipo 1 expresado en monocitos activados, DCs, NKT, Linfocitos B y T. La interacción de PD-1 con sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, desencadena señales inhibitoras que disminuye las respuestas de sobrevida, diferenciación y secreción de citoquinas proinflamatorias. Además de por gatillar señales inhibitoras reversas en su interacción con PD-1 o CD80. Ambos ligandos se encuentran altamente expresado en Tregs y están involucrados en la inducción de más Tregs y en sus funciones supresoras(50–52). Esta evidencia genero diversas investigaciones para descubrir funciones similares de PD-1 y sus ligandos en la biología de los Bregs.

En el año 2014 el grupo Landay demostró que el bloqueo en conjunto del receptor de IL-10 y de la interacción PD-1/PD-L1 favorecía la proliferación de linfocitos T CD4 y de linfocitos T citotóxicos específicos para VIH en pacientes infectados con VIH, sugiriendo un mecanismo sinérgico entre IL-10 y PD-L1 (53). En otro estudio se observó que una población de Bregs CD5hiPD-1+ se encuentra enriquecida en el microambiente de carcinoma hepatocelular y de producir IL-10 tras la interacción de PD-1 con PD-L1, favoreciendo el crecimiento tumoral (54). También se demostró que Bregs PD-1+PD-L1<sup>high</sup> se infiltran en tumores de tiroides y disminuyen la supervivencia de linfocitos T CD4 + y CD8 +, un efecto que fue revertido al bloquear PD-L1 (55). Interesantemente, en otro estudio se demostró que IL-18 favorece la inmunosupresión medida por Bregs en cáncer pancreático y que este fenómeno depende de la interacción PD-1/PD-L1 (56).

Por otro lado, se demostró que la transferencia adoptiva de linfocitos B PD-L1<sup>hi</sup> al modelo murino EAE da como resultado una enfermedad más leve asociada con una expansión reducida de las linfocitos Tfh, así como una disminución de anticuerpos IgG antígeno-específicos y linfocitos Th1 / Th17 (57). En un estudio reciente, utilizando lisados bacterianos se logró inducir una población de linfocitos CD19+TIM-1+PD-1+ capaces de generar linfocitos Tr1, fenómeno dependiente de la interacción PD-1/PD-L1 (58). En autoinmunidad, se han observado alteraciones en las poblaciones Bregs PD-1+, PD-L1+ y PD-L2+ (59–61), especialmente en Artritis Reumatoide se observó que la población de linfocitos B PD-L1+ con capacidad supresora sobre linfocitos T se encuentra disminuida en pacientes sin tratar en comparación a pacientes con tratamientos efectivos (62). En conjunto, estos hallazgos indicarían un nuevo

mecanismo regulador ejercido por los Bregs y que podría ser blanco de estudio para otras interacciones celulares y para futura terapias dirigidas contra eje el PD-1 / PD-L1.

### **3.5. TIM-1 como marcador de Bregs**

La proteína de dominio de mucina e inmunoglobulina 1 de células T (TIM-1), pertenece a la familia de moléculas TIM, caracterizada estructuralmente por un dominio de inmunoglobulina del subtipo V en el extremo N-terminal, seguido de un dominio mucina-Like, un solo segmento de transmembrana y una cola citoplasmática de largo variable (63) TIM-1 en los últimos años ha ganado relevancia en su rol en la respuesta inmune (64). Esta molécula se encuentra expresada en diversas células del sistema inmune, linfocitos T del perfil Th2, mastocitos, linfocitos T natural killers (NKT), macrófagos y en células dendríticas (65). TIM-1 tiene como ligando natural a TIM-1 y TIM-4(66), este último expresado en las células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas; y la fosfatidilserina presente en los cuerpos apoptóticos (67).

Se ha reportado que la frecuencia de linfocitos B TIM-1+ se encuentra aumentada en pacientes trasplantados de riñón que logran tolerar el órgano en ausencia de inmunosupresión (68). En autoinmunidad, se ha observado que cerca del 90% de células B transicionales expresan IL-10 y co-expresan TIM-1 y que, en comparación a controles sanos, pacientes con Esclerosis Sistémica (ES), presentan esta población disminuida e incapaz de suprimir respuesta T inflamatorias. (69). Además, se ha observado que linfocitos B CD27+TIM-1+ son capaces de inducir linfocitos Tregs



Foxp3+, dependiente de TGF- $\beta$ , y que una mayor frecuencia de esta población sugiere un mejor pronóstico en pacientes con síndrome respiratorio agudo (70).

Más aun, se han reportado evidencias sobre la importancia de TIM-1 en el efecto regulador de los linfocitos B. El uso de un anticuerpo de baja afinidad agonista de TIM-1 en ratones que padecen de EAE, disminuye drásticamente la severidad de la enfermedad y este efecto se pierde en ratones deficientes de linfocitos B, observando nuevamente la disminución de severidad de la EAE cuando los animales son reconstituidos con linfocitos B tratados con este anticuerpo. (71). Otros estudios han mostrado que linfocitos B TIM-1+ murinos son capaces de inhibir la inducción de linfocitos T CD4+ Th17, e inducir linfocitos T CD4+Foxp3+ y linfocitos T CD4+IL-10+ en mayor proporción que linfocitos B TIM-1-, efecto dependiente del dominio de mucina del TIM-1 (72).

En la actualidad no existe claridad sobre como TIM-1 en linfocitos B humanos puede regular un perfil antiinflamatorio ni como estarían interactuando con otras células del sistema inmune.

### **3.6. Linfocitos B reguladores humanos y su rol en autoinmunidad**

El estudio de linfocitos B reguladores en humanos lleva poco más de 10 años, los primeros reportes se llevaron a cabo en el año 2007 Duddy y colaboradores demostraron que la activación del CD40 en linfocitos B vírgenes estimula la secreción de IL-10 (73). Esto fue confirmado posteriormente cuando se demostró que la población de linfocitos CD19+CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> poseían la capacidad secretar altos niveles de IL-10 cuando son estimuladas con CD40L en comparación a las células B naïve y de memoria, e inhibir la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  por linfocitos T

CD4+(74). Resultados similares se consiguen cuando los linfocitos B son estimulados vía TLR9 y BCR en cuanto a su capacidad de secreción de IL-10 y características inhibitorias (75). Así como también, la estimulación de las células B vía CD40 también ha mostrado evidencia de inducir la secreción de IL-10, células capaces de generar linfocitos T reguladores de manera alo-específica (76).

En relación a la frecuencia o capacidad inhibitoria de los linfocitos B reguladores en autoinmunidad se ha descrito que estos poseen una secreción de IL-10 disminuida en Esclerosis Múltiple (73), algo similar ocurre en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE), cuyos Bregs presentan una habilidad alterada de producir IL-10 luego de la activación del CD40 (74). Sin embargo, otros reportes describen elevadas frecuencias de Bregs, caracterizados como CD19+CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> en pacientes con enfermedades autoinmunes tales como SLE, y síndrome de Sjögren en comparación a individuos sanos (45,77). En un trabajo previo de nuestro grupo, pudimos observar una elevada frecuencia de Bregs en pacientes con Esclerosis Sistémica, pero funcionalmente alterados, ya que dichos linfocitos expresaban y secretaban menores niveles de IL-10 en comparación a controles sanos (78).

### **3.7. Bregs en Artritis Reumatoide**

El rol de los Bregs en la AR ha sido poco estudiado, evidencia reciente muestran una correlación positiva entre los niveles séricos del marcador de resorción ósea, CTX-1 y el porcentaje de linfocitos B CD5+ (79). También se ha visto alteraciones en la frecuencia de Bregs CD5+CD1<sup>hi</sup> en pacientes con AR, donde dicha frecuencia se encuentra correlacionada inversamente con el puntaje de actividad de la enfermedad,

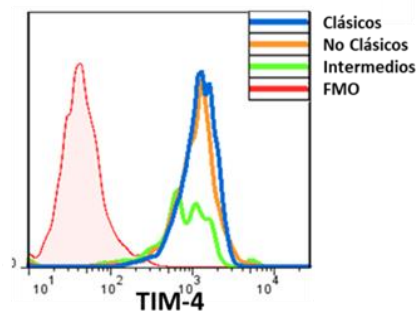
DAS28. (80). Utilizando TIM-1 como marcador de Bregs, Ma y colaboradores observaron una disminución en la frecuencia de esta población en pacientes con AR en comparación a controles sanos, valores que se correlacionan positivamente con la frecuencia de linfocitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3 en dichos pacientes (81). En cuanto la función de las Bregs en AR existe escasa evidencia documentada, un trabajo mostró que los Bregs CD19+CD24highCD38high provenientes de pacientes con AR son incapaces de generar Tregs, desde linfocitos T CD4+CD25-, y de inhibir el desarrollo de linfocitos Th17, a diferencia de las Bregs provenientes de controles sanos (82).

### **3.8. Interacción de Bregs con Monocitos**

Diversas evidencias han sido expuestas en como los Bregs pueden ejercer su función reguladora, principalmente en su efecto sobre linfocitos T, generando Tregs Foxp3+ y Tr1, o inhibiendo perfiles efectores Th1 y Th17, pero existe poca información acerca de cómo los Bregs pueden interactuar con las otras células coordinadoras de la respuesta inmune y que su vez tienen un gran rol en la AR, como los monocitos. Existe poca evidencia de la interacción entre estos 2 tipos celulares, un estudio evaluó el efecto de linfocitos B sobre la diferenciación de monocitos a células dendríticas, mediante GM-CSF e IL-4, en presencia de agonistas del BCR y TLR9, observando una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación antigénica en las DCs (83). Además otro grupo identificó una población de Bregs CD19+CD38+CD23lowCD27- capaces de interferir en la diferenciación de mo-DCs

inmaduras hacia DCs maduras, efecto mediado parcialmente por CD62L, y otros factores solubles o moléculas no identificadas a la fecha (84).

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que todas las subpoblaciones de monocitos expresan TIM-4 (Fig. 2), por lo podría existir una interacción por esta vía con los linfocitos B TIM-1+. Hasta la fecha no existen mayores antecedentes sobre la modulación en la interacción Breg-Monocitos, por lo que estudios con moléculas recientemente descritas ayudaría a dilucidar de mejor forma la interacción entre ambas poblaciones y determinar los mecanismos de regulación involucrados entre estos dos tipos celulares.



**Figura 2 Expresión de TIM-4 en monocitos:**

Histograma representativo de la expresión de TIM-4 en las subpoblaciones de monocitos.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, 1) La Artritis Reumatoide es una enfermedad autoinmune con gran impacto en la calidad de vida de los pacientes en donde los monocitos juegan un rol relevante en la Inmunopatogénesis; 2) los linfocitos B reguladores son una población celular relevante en la mantención de la tolerancia inmune; 3) El eje PD-1/Ligandos de PD-1 podría cumplir un rol relevante en la regulación mediada por Bregs 4) TIM-1, es capaz de identificar una subpoblación de Bregs, la cual se encuentra disminuida en autoinmunidad; 5) TIM-1 podría ser esencial para la función reguladora y que 5) el ligando natural de TIM-1 es TIM-4 es expresado en monocitos, células relevantes en el establecimiento y progresión de la AR,

postulamos a los ejes PD-1/Ligandos de PD-1 y TIM-1/TIM-4 como mecanismo reguladores relevantes en la interacción Bregs-Monocitos, comunicación que permitiría contribuir en la mantención de la tolerancia inmune, pudiendo encontrarse estos mecanismos alterados en Artritis Reumatoide.

#### **4. Hipótesis**

1: Los Linfocitos B regulan la activación de monocitos a través mecanismos que dependen de la interacción TIM-1/TIM-4 y/o PD-1/Ligandos de PD-1.

2: La regulación de la activación de monocitos mediada por Linfocitos B reguladores se encuentra alterada en pacientes con Artritis Reumatoide.

## **5. Objetivo General**

Estudiar la interacción TIM-1/TIM-4 y PD-1/Ligandos de PD-1 como mecanismo de regulación inmune entre Linfocitos B reguladores y monocitos en controles sanos y en pacientes con artritis reumatoide.

## **6. Objetivos Específicos**

1. Evaluar el efecto de los linfocitos B reguladores sobre la función de monocitos.
2. Determinar el efecto regulador de la molécula TIM-1 y de PD-1 con sus ligandos TIM-4 y PD-L1/PD-L2, respectivamente, en la interacción de linfocitos B reguladores con monocitos
3. Determinar alteraciones en la comunicación del eje TIM-1/TIM-4 y PD-1/PD-L1 y PD-L2 entre linfocitos B reguladores y monocitos de pacientes con Artritis Reumatoide.

## **7. Metodología**

### **7.1. Reclutamiento y caracterización clínica de pacientes con AR**

Se reclutaron 12 pacientes desde la Unidad de Dolor del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH) y fueron evaluados por la reumatóloga Lilian Soto. Previa firma de un consentimiento informado (Anexo) aprobado con el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (Anexo) y del HCUCH, se le extraerán 60 mL de sangre a través de una punción venosa.

Los pacientes con AR cumplían los siguientes Criterios de Inclusión: 1) Hombres o mujeres mayores de 18 años. 2) Personas capaces de entender y firmar el formulario de Consentimiento informado. 3) Pacientes que cumplían con los criterios diagnósticos de AR, del Colegio Americano de Reumatología (ACR) 2010, recientemente diagnosticados (<6 meses) y pacientes con la enfermedad establecida (>18 meses). 4) Pacientes que se encontraban en terapia modificadora de la enfermedad (DMARD), tradicional o sintética, en las siguientes dosis: Prednisona dosis 10mg al día o menos, Metotrexato en dosis menores a 20mg/semanal. Hidroxicloroquina 200mg al día o leflunomida 20 mg al día o sulfasalazina 2gr al día.

Los Criterios de Exclusión para pacientes fueron: 1) Mujeres embarazadas o en período de lactancia. 2) Personas que hubiesen recibido en los últimos 6 meses inmunosupresión mayor. 3) Pacientes que hubiesen recibido una terapia biológica anti-CD20, cuya última dosis hubiese sido dentro de un período de 6 meses antes de la recolección de muestra. 4) Pacientes que se encontraban participando en un estudio clínico con alguna droga. 5) Pacientes con otra condición reumatológica.



## **7.2. Reclutamiento de Controles Sanos**

Se obtuvieron 20 muestras de *Buffy Coat* desde el banco de sangre del HCUCH a partir de controles sanos voluntario que firmaron el consentimiento informado correspondiente (Anexo).

## **7.3. Extracción de linfocitos B, Monocitos y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con AR.**

Previa lectura y firma del consentimiento informado (Ver Anexo) por parte de cada paciente, aproximadamente 45 mL de sangre periférica fue obtenida por un profesional capacitado y depositada en tubos heparinizados. Para la obtención de PBMC, 40 mL de la sangre obtenida se mezcló con un volumen equivalente de buffer fosfato salino (PBS) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,0 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,0 mM;  $\text{NaCl}$  1,55 M) y distribuyó por igual en 3 tubos cónicos de 50 mL. Se agregó cuidadosamente bajo la muestra 15 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK) para crear un gradiente de densidad y se centrifugó a 1200 g por 20 minutos. Posteriormente se extrajo la porción mononuclear situada en la fase del centro de las 3 formadas, se unificaron las 3 porciones extraídas y se lavaron con buffer PBS centrifugando 5 minutos a 600g. Luego se resuspendió las células en 10 mL de tampón PBS y se cuantificaron utilizando el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, EUA). A continuación, se apartó para tinción fenotípica el volumen necesario de suspensión celular calculado para 7 millones de células. El volumen restante se centrifugó por 5 minutos a 600g y se resuspendió en los 5 mL restantes de sangre periférica, muestra denominada sangre optimizada. Posteriormente esta muestra se

procesó para la obtención de linfocitos B y Monocitos mediante el uso del cóctel de enriquecimiento por selección negativa *RosetteSep® Human B cell Enrichment Cocktail* (StemCell, Canadá) y *RosetteSep® Human Monocyte Enrichment Cocktail* respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. La fracción enriquecida en linfocitos B o Monocitos se diluyó en buffer PBS suplementado con 2% v/v de suero fetal bovino (SFB, Hyclone, EUA) y fue centrifugada por 5 minutos a 500g. El precipitado celular se resuspendió en solución de ACK (NH<sub>4</sub>Cl 1,5 M; KHCO<sub>3</sub> 0,1 M; Na<sub>2</sub>-EDTA 1,0 mM) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para lisar remanentes eritrocitarios. Luego, las células se centrifugaron por 5 minutos a 500g, resuspendidas en PBS-SFB 2% v/v, y se cuantificaron utilizando el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 900 rpm por 10 minutos, para la eliminación de plaquetas. Finalmente, el precipitado se resuspendió en medio de cultivo (RPMI-SFB 10% P/S 1x para su posterior uso.

#### **7.4. Extracción de linfocitos B, Monocitos y de células PBMC de controles sanos.**

Muestras de concentrados leucocitarios (*buffy coats*) de sangre periférica de donantes sanos fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, bajo los protocolos establecidos por dicha institución y en base a donantes que aceptaron participar del proyecto previa lectura y firma de un consentimiento informado (Ver Anexo). Para la obtención de PBMC, se utilizó 1 mL del concentrado leucocitario y se procesó de igual forma que la sangre periférica de

pacientes. Para la obtención de linfocitos B y Monocitos, el volumen restante del concentrado se procesó de igual forma que la sangre optimizada de pacientes.

### **7.5. Inducción de Linfocitos B reguladores**

Linfocitos B aislados en el pase anterior fueron cultivados a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL en medio de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. La activación se realizó agregando anticuerpos agonistas del BCR, *AffiniPure Goat Anti-Human IgG + IgM (H+L)* (Jackson Immuno Research, EUA) a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  y CpG-B ODN 206 (Invivogen, EUA) a una concentración de 3  $\mu\text{g/mL}$ . Paralelamente se cultivaron linfocitos B sin estimular en medio de cultivo por 48 horas a modo de control. Las células se cultivaron durante 48 horas en condiciones estándar (37°C y 5% CO<sub>2</sub>), pasado este tiempo los linfocitos son lavados con medio de cultivo fresco.

### **7.6. Caracterización fenotípica y funcional de los Linfocitos B reguladores Inducidos**

#### **7.6.1. Evaluación de la secreción de IL-10:**

La cuantificación de la citoquina IL-10 secretada por los linfocitos B se realizó mediante un ensayo de ELISA tipo *sándwich*. Los anticuerpos de captura y detección, la citoquina rhIL-10, y la enzima HRP conjugada con avidina fueron provistas por eBioscience. En placas de 96 pocillos transparentes y con fondo plano MaxiSorp (Nunc, USA) se incubó 1  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo de captura a 4°C durante una noche, se lavó con PBS suplementado con Tween 20 (US Biologicals, EUA) al 0,05% v/v y se dejó bloqueando con PBS suplementado con albúmina de suero bovino (BSA;

Rockland Immunochemicals, EUA) al 1% p/v. Luego de 2 hora de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó y cargó con las muestras previamente descongeladas y con su respectiva curva de calibración estándar, dejando en incubación por la noche a 4°C. Posteriormente, la placa se lavó y cargó con 1 µg/mL de anticuerpo de detección y con avidina-HRP 1:500, se dejó en incubación por 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se lavó la placa y se agregó el sustrato TMB (Biolegend) y se dejó en incubación en oscuridad hasta que los puntos más altos llegaron a una densidad óptica (DO), medida a 620 nm, de 0,6. Para detener la reacción enzimática se agregó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, cambiando la solución de color azul a amarillo. Finalmente se midió la DO a 450 nm, normalizada con la DO a 620 nm, en un lector de absorbancia para placas (Tecan, Suiza).

#### 7.6.2. Cuantificación de niveles de mensajero mediante qPCR

A partir de  $5 \times 10^5$  linfocitos B o iBregs se extrajo el RNA total utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, posteriormente fue evaluada la concentración, integridad y pureza del material genético obtenido mediante espectrofotometría de microvolumen. El material obtenido fue luego convertido a cDNA mediante *iScript cDNA Synthesis kit* (Bio-Rad, EUA). Finalmente se realizaron qPCRs en el equipo *Mx3000p qPCR System* (Agilent Technologies, EUA) utilizando las condiciones óptimas para cada par de partidores. Se utilizó el método del delta Ct para la variación de expresión de cada gen y el posterior cálculo de variaciones relativas ( $Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) usando GAPDH como *housekeeping*. En la tabla I se enlistan los partidores utilizados.

<b>Moléculas</b>	<b>Secuencias</b>
IL-10	F: 5' CTC ATG GCT TTG TAG ATG CC 3' R: 5' CTC ATG GCT TTG TAG ATG CC 3'
TGF-B	F: 5' CCC AGC ATC TGC AAA GCT C 3' R: 5' GTC AAT GTA CAG CTG CCG CA 3'
TIM-1	F: 5' CTT AAG CCT CAT CCT ACA TCT GG 3' R: 5' GTG GCA GGG TAG TGT GAC AG 3'
GAPDH	F: 5' GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G 3' R: 5' ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A 3'

**Tabla 1 Lista de Partidores utilizados**

7.6.3. Determinación de la Expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo

Los anticuerpos utilizados en esta sección fueron los siguientes: anti ( $\alpha$ -) CD19 FITC,  $\alpha$ -TIM-1 PE,  $\alpha$ -PD-1 BV605,  $\alpha$ -PD-L1 BV650 y  $\alpha$ -PD-L2 APC-Cy7(Biolegend, San Diego, CA, EUA) la sonda de viabilidad utilizada fue FVD efluor 450 (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células obtenidas al final de las 48 horas fueron colocadas placas de 96 pocillos con fondo cónico a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL, se centrifugaron a 500g por 2 minutos a 4°C, y resuspendieron en PBS-SFB al 2% v/v. Luego, las células se incubaron con los anticuerpos de superficie por 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Al término de la incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBS + 2% SFB v/v y se resuspendieron en buffer FACS (BD Bioscience, USA) para su posterior adquisición en el citómetro de flujo.

Para todos los casos las células se adquirieron en el citómetro de flujo LSRFortessa usando el programa computacional FACSDiva (Beckton Dickinson, EUA) en el *Cytometry Facility Center* del ICBM, UCH; el análisis posterior de los datos se realizó usando el programa el programa FlowJo 10 (Tree Star Inc, EUA).

#### 7.6.4. Capacidad Inhibitoria de los Linfocitos B reguladores

##### 7.6.4.1. Co-cultivos de Linfocitos B con Linfocitos T

Linfocitos T CD4 fueron aislados a la par que los Linfocitos B desde un mismo concentrado leucocitario mediante el uso del kit *RosetteSep® Human CD4+ T cell Enrichment Cocktail* (Stemcell, Canadá), utilizando el mismo protocolo para linfocitos B, al final de la extracción fueron lavados y resuspendidos en DMSO-SFB 10% para su criopreservación a -80°C durante el tiempo que se inducían los iBregs. A las 48 horas los linfocitos T fueron descongelados, marcados con CFSE según recomendaciones del proveedor y sembrados a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL en placas de 96 pocillos fondo plano las cuales fueron previamente tratadas con el anticuerpo anti-CD3 por 40 min, inmediatamente se agregan los linfocitos B o iBregs obtenidos del mismo donante y se cultivaron por 72 horas en condiciones estándar. En las últimas 5 horas del cultivo, se agregó a cada condición phorbol 12-myristate 13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich, USA) a 50 ng/ml, ionomicina (Io) (Sigma-Aldrich, USA) a 1 µg/ml para estimular la producción de citoquinas y brefeldina A (eBioscience, USA) al 1x para inhibir la secreción de éstas. Al término de las 72 horas las células son recuperadas y preparadas para el siguiente procedimiento.

#### 7.6.4.2. Determinación de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo.

Las células obtenidas fueron teñidas con el protocolo de tinción de superficie antes mencionado utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -CD19 FITC y  $\alpha$ -CD4 BV785; más la sonda de viabilidad, al finalizar se inicia el protocolo de tinción intracelular, para tales efectos, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en IC Fixation para su fijación durante 30 min a RT, y posteriormente lavadas y resuspendidas en PermWash (ebioscience, EUA), se agregaron los anticuerpo  $\alpha$ -IL10 PE y  $\alpha$ -TNF- $\alpha$  BV605 y se incubó por 40 minutos a RT. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células se lavaron con buffer de tinción y se resuspendieron en buffer FACS para su adquisición en el citómetro.

### **7.7. Evaluación del efecto de iBregs sobre monocitos.**

#### 7.7.1. Co-cultivos de Linfocitos B con Monocitos

Los monocitos obtenidos anteriormente fueron cultivados solos o co-cultivados en una razón 1:4 en presencia de linfocitos B o iBregs autólogos durante 72 horas en condiciones estándar. Los co-cultivos fueron realizados en placas de 48 pocillos fondo plano en condiciones clásicas (contacto) o en condiciones Transwell utilizando un poro de 0.4 $\mu$ m (Corning, EUA). Los monocitos fueron ubicados en la cámara superior y los linfocitos B o iBregs en la inferior. Al finalizar las células fueron cosechadas para los siguientes análisis o estudios.

#### 7.7.2. Detección de moléculas de superficie en Monocitos

Las células recuperadas al finalizar el co-cultivo fueron teñidas siguiendo el protocolo de tinción de superficie y de viabilidad utilizando los siguientes anticuerpos,  $\alpha$ -CD19 BV650,  $\alpha$ -CD14 APC-Cy7,  $\alpha$ -CD86 FITC,  $\alpha$ -TIM-4 PE y  $\alpha$ -HLA-DR BV711; posteriormente fueron llevadas al citómetro de flujo.

#### 7.7.3. Secreción de IL-10 y TNF- $\alpha$ por Monocitos activados

Los monocitos recuperados de las condiciones Transwell y solos fueron nuevamente cultivados durante 24 horas en presencia de lipopolisacárido (LPS) a una concentración de un 1  $\mu$ g/mL. En las últimas 5 horas de cultivo se agregó PMA e Ionomicina. Finalmente se recuperó el sobrenadante y realizó la detección de IL-10 y de TNF- $\alpha$  mediante test de ELISA utilizando los anticuerpos de captura y detección correspondientes usando el protocolo antes descrito.

#### 7.7.4. Expresión de IL-10 y TNF- $\alpha$ por Monocitos activados

Las células recuperadas de las condiciones clásicas y los monocitos solos fueron estimuladas con LPS, según el protocolo descrito anteriormente, agregando además Brefeldina A en las últimas 5 horas de cultivo. Las células fueron cosechadas y teñidas con el protocolo de tinción de superficie, viabilidad e intracelular utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -CD19 FITC,  $\alpha$ -CD14 APC-Cy7,  $\alpha$ -IL-10 PE y  $\alpha$ -TNF- $\alpha$  BV605. Finalizado el protocolo las muestras fueron llevadas al citómetro de flujo para su adquisición.



## **7.8. Determinación del rol de TIM-1 y PD-1 y sus Ligandos en la interacción de Linfocitos B y Monocitos**

### 7.8.1. Determinación de TIM-1 y GAPD mediante Western Blot

A partir de  $5 \times 10^5$  linfocitos B, iBregs o Huh7.5 se extrajo proteína total mediante el uso de Buffer RIPA (Merck, Alemania) en presencia de inhibidores de proteasas *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Suiza). La concentración de proteínas obtenidas fue realizada mediante el uso del kit de *BCA Protein Assay kit* (Thermo, EUA). Entre 10 y 30  $\mu\text{g}$  de proteína fueron cargados en geles de acrilamida al 12% y se resolvieron las proteínas realizando un SDS-PAGE. Una vez resuelto el gel se realizó la transferencia húmeda de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Thermo, EUA) con amperaje constante durante 1.5 horas. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con una solución de BSA al 5% durante 1 hora e incubada con un anticuerpo anti-TIM-1 (PA5-20244, Thermo, EUA) durante la noche a 4°C. Luego la membrana fue lavada en Buffer Tris salino con Tween al 0.05% (TBS-T) 3 veces durante 5 minutos e incubada con el anticuerpo *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP* (Thermo, EUA) durante 1 hora a RT. Finalmente, la membrana fue lavada en TBS-T 5 veces durante 5 minutos y se utilizó el kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Plus* (Thermo, EUA) para el revelado la membrana en películas de autoradiografía. Como control de carga se utilizó la detección de beta-actina (PA1-16889, Thermo, EUA) utilizando este mismo protocolo.

### 7.8.2. Silenciamiento Génico de TIM-1 mediante magnetofección de si-RNA

Linfocitos B o células Huh 7.5 fueron sembradas en placas de fondo plano, y sometidas el protocolo de Magnetofección de OzBioescience (OzBioscience. Francia), siguiendo

las indicaciones del fabricante. El material genético utilizado correspondía a ON-TARGETplus Human HAVCR1 siRNA, ON-TARGETplus GAPD Control Pool y ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool todos adquiridos en *Horizon* (Horizon Discovery, RU), las concentraciones utilizadas fueron determinadas experimentalmente. Las células fueron incubadas por 48 horas en condiciones estándar, al finalizar las células fueron cosechadas para el protocolo de extracción de proteínas y de Western Blot.

#### 7.8.3. Co-cultivos de Monocitos con línea celular Huh 7.5 TIM-1 KD

Monocitos purificados fueron co-cultivados con la línea celular Huh 7.5 sin tratar, KD para TIM-1 y tratada con siRNA sin blanco; a una razón de 10:1 durante 24 horas en condiciones estándar, pasado este periodo de tiempo las células fueron teñidas con el protocolo de tinción de superficie para monocitos y evaluados mediante citometría de flujo.

#### 7.8.4. Bloqueo de PD-1 y PD-L1 en co-cultivos.

Se realizó el mismo protocolo de co-cultivo utilizado en el punto 7.7.1 pero los iBregs fueron incubados previamente durante 30 minutos en presencia de los anticuerpos *Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD279 (PD-1) Antibody* o *Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody* para bloquear PD-1 o PD-L1 respectivamente. Se utilizó el isotipo *Ultra-LEAF™ Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody* correspondiente, todos obtenidos desde *BioLegend* (Biolegend, EUA). Posterior la incubación, los iBregs fueron lavados y utilizados según el protocolo señalado de co-cultivo.

## **7.9. Estudios realizados en muestras de pacientes**

### **7.9.1. Fenotipificación de Linfocitos B, iBregs y Monocitos**

En las muestras provenientes de pacientes se evaluó mediante citometría de flujo la frecuencia de subpoblaciones de linfocitos B: Naive (CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), Memoria (CD24<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) y Transicional (CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) en PBMC; y las moléculas de superficie evaluadas en la inducción de iBregs. En monocitos se evaluó la expresión de CD14 y TIM-4 en PBMC.

### **7.9.2. Capacidad Inhibitoria de los Linfocitos B y iBregs sobre monocitos**

Se realizaron los co-cultivos siguiendo el protocolo indicado en 7.7.1 pero solo en las condiciones clásicas. Posteriormente se evaluó la expresión de moléculas en los monocitos siguiendo el protocolo en 7.7.2.

## **7.10. Análisis estadísticos.**

Todas las variables estimadas fueron sometidas a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks, y de acuerdo con el resultado se decidieron las pruebas estadísticas a aplicar en cada caso si las variables presentaban una distribución no normal o normal.

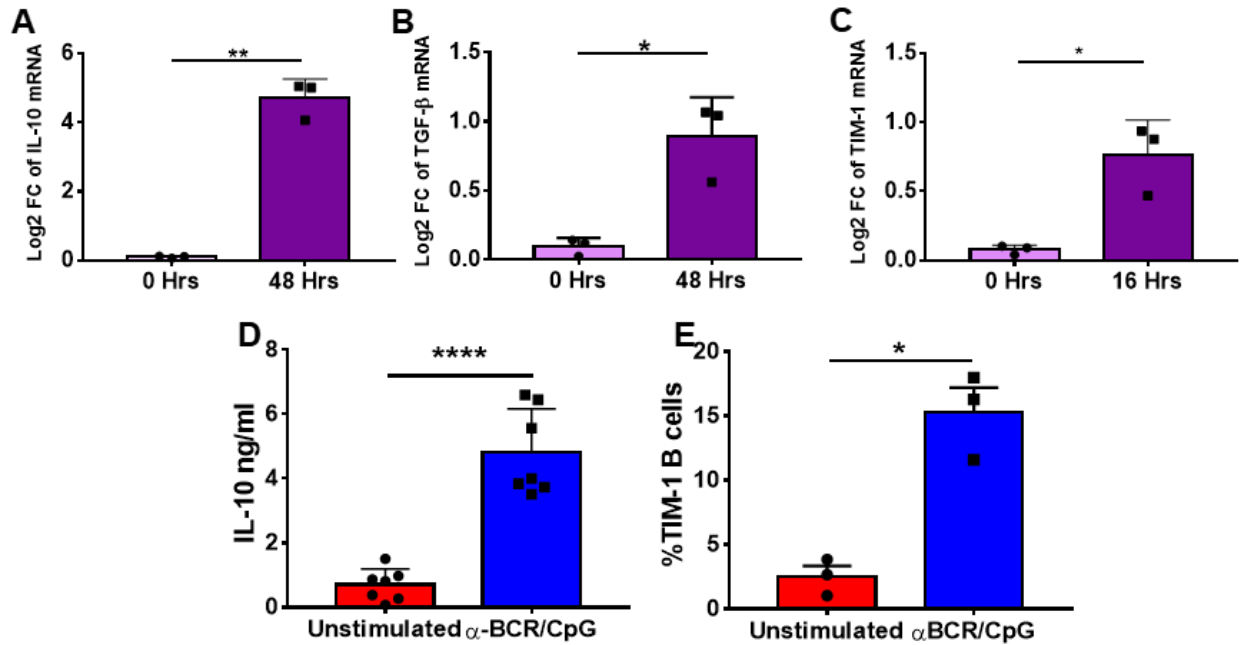
Para analizar las diferencias de una variable de intervalo entre dos grupos de datos en un grupo de individuos, como la inducción de una molécula por estímulo, se aplicó la prueba de Wilcoxon o una prueba t de student para muestras pareadas, según correspondiera. Para comparar variables continuas entre dos grupos de individuos, como las comparaciones entre frecuencias de poblaciones o expresiones de una molécula entre controles sanos y pacientes, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney o la prueba t de student para muestras no pareadas, según correspondiera. Para

comparar una variable de intervalo dentro de 3 o más grupos de datos pareados (variable nominal), como la expresión de una molécula en monocitos frente a diferentes condiciones de co-cultivo, se aplicó un test de Friedman o un test RM-ANOVA de una vía con post test de Tukey para realizar múltiples comparaciones, según correspondiera. Los datos se procesaron en el software Graphpad Prism versión 7.0 (San Diego, CA, USA) para Windows.

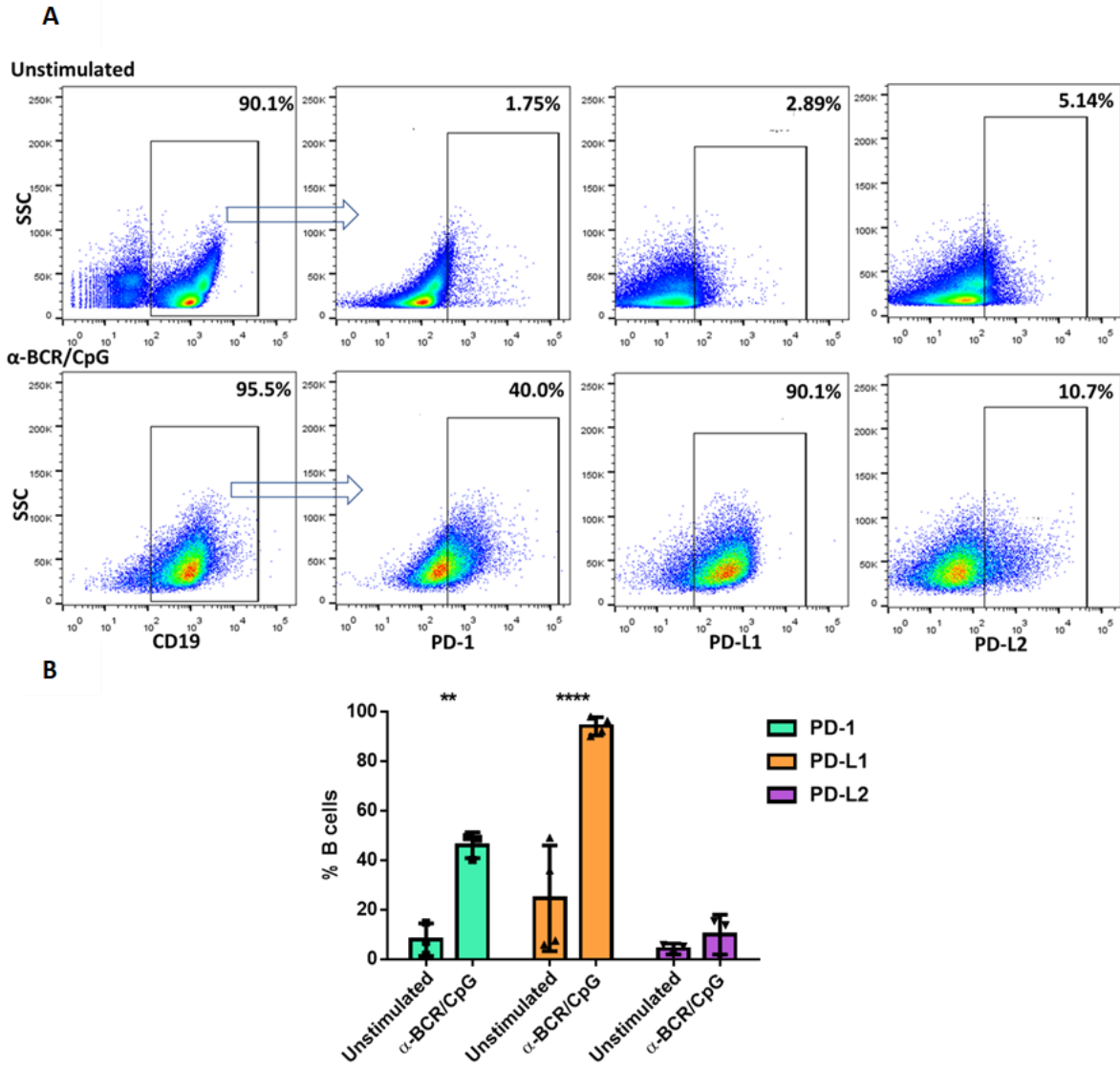
## 8. Resultados

### **Objetivo Específico 1: Evaluar el efecto de los linfocitos B reguladores sobre la función de monocitos.**

Como aproximación para abordar este objetivo, se evaluó el efecto de los linfocitos B reguladores inducidos (iBregs) sobre el fenotipo de monocitos autólogos desde controles sanos. Para llevar esto a cabo, previa firma del consentimiento informado, a partir de concentrados leucocitarios provenientes del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se aislaron linfocitos B y monocitos mediante el uso de kits de selección negativa (RosetteSep, Stemcell). Los iBregs fueron generados activando el BCR y TLR9 de los linfocitos B con anti-BCR (10ug/ml) y CpG (3ug/ml) durante 48hrs, comprobado mediante la expresión de TIM-1 en la membrana de los linfocitos B, y de la secreción de IL-10 (69), se evaluó también los niveles de transcrito de TIM-1, IL-10 y TGF- $\beta$  (Figura 3). Bajo nuestro protocolo de inducción evaluamos por primera vez la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2, donde observamos un incremento significativo de la frecuencia linfocitos B positivos para PD-1 y PD-L1 48 horas después de los estímulos en relación a linfocitos B sin estimular, esto nos permite complementar el perfil fenotípico de las Bregs diferenciadas *ex vivo* bajo nuestro protocolo y estudiar este eje como un posible mecanismo que ejercen estas células (Figura 4).



**Figura 3 Caracterización de linfocitos B reguladores inducidos (iBregs)** Linfocitos B fueron estimulados con anti-BCR (10ug/ml) y CpG (3ug/ml) durante 48hrs, se evaluó el genotipo y fenotipo de los iBregs generados. Log<sub>2</sub> del Fold Change de A) IL-10, B) TGF-β y C) TIM-1 evaluado mediante qPCR, D) Secreción IL-10 en sobrenadante evaluado por ELISA, E) Frecuencia de linfocitos B TIM-1+. A-E, t test pareado, n=7 en D, n=3 en A-C y E; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001



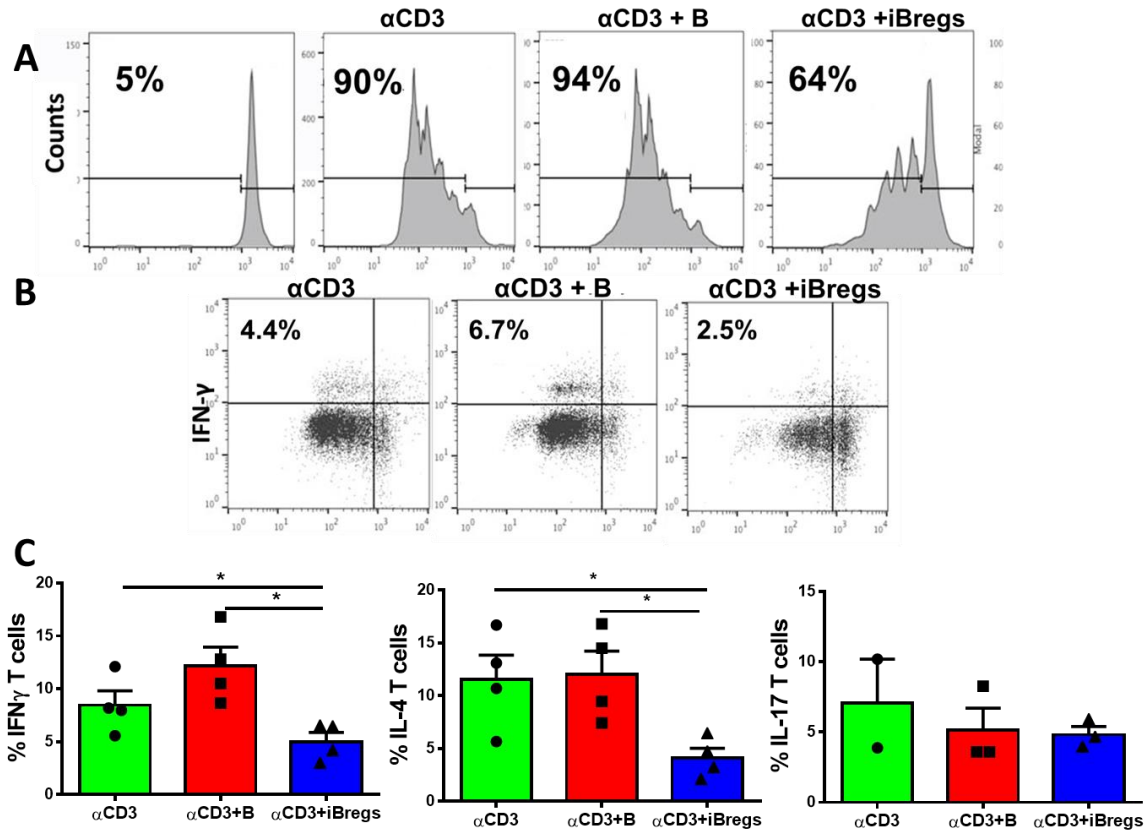
**Figura 4 Expresión de PD-1 y sus ligandos en Linfocitos B reguladores inducidos (iBregs).** Linfocitos B fueron estimulados con anti-BCR (10ug/ml) y CpG (3ug/ml) durante 48hrs, se evaluó la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 sobre células CD19+.

A) Dotplots representativos de la frecuencia de linfocitos B para los tres marcadores

B) Gráfico acumulado de 4 experimentos independientes. t test pareado en cada marcador, n=4; \*\* p<0.01 \*\*\*\* p<0.0001

Una de las cualidades clásicas descritas para un Breg, es su capacidad de inhibir respuestas T efectoras, tanto en su proliferación como en su secreción de citoquinas. Evaluamos entonces esta capacidad de nuestras células inducidas en co-cultivos iBregs o linfocitos B sin estimular, en co-cultivo con linfocitos T CD4+ aislados activados policlonalmente con  $\alpha$ CD3, en la figura 5 observamos que los iBregs son capaces de inhibir la proliferación y la expresión de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4 en linfocitos T activados, de esta forma comprobamos que nuestro protocolo de generación de iBregs produce linfocitos con las capacidades regulatorias clásicas.



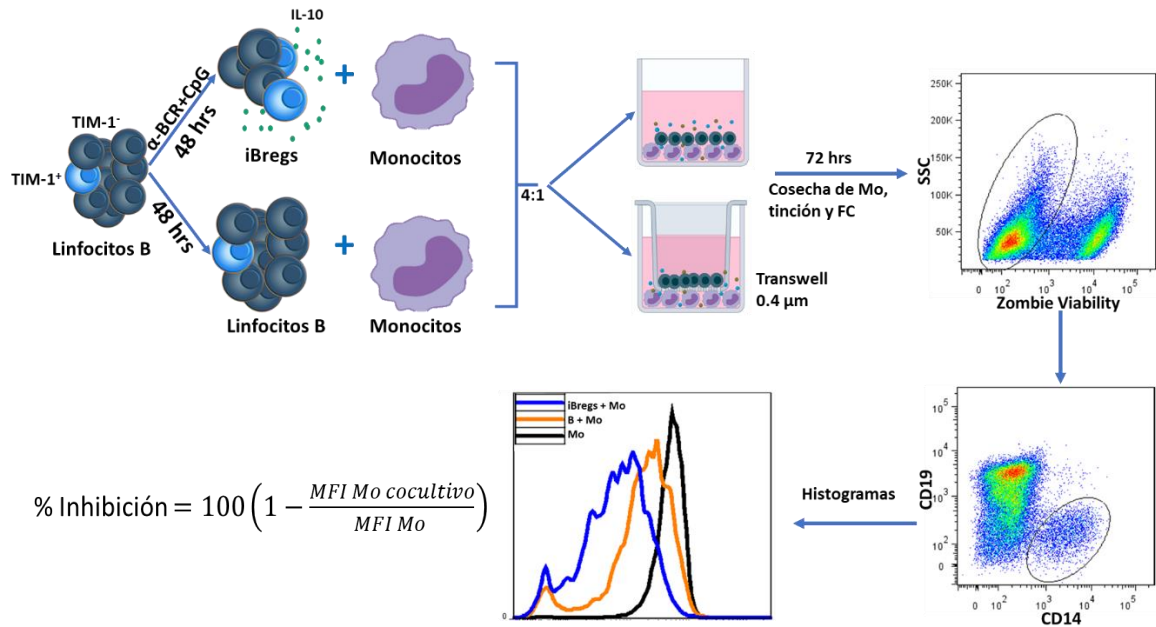


**Figura 5. Inhibición de la respuesta efectoras en linfocitos T por iBregs:** A) histogramas representativos de la proliferación en linfocitos T medido por el decaimiento de CFSE en linfocitos T sin estimular, estimulados policonalmente con un anti-CD3 y estimulados en co-cultivo en presencia de linfocitos B sin estimular o con iBregs. B) Dotplots representativos de la inhibición en la expresión de INF- $\gamma$  en linfocitos T proliferantes, en las condiciones antes descritas. C) representación gráfica de 3 y 4 experimentos independientes de la expresión de IFN- $\gamma$  (izq.), IL-4 (med.) e IL-17 (der.) en linfocitos T proliferantes en las condiciones antes indicadas, determinado por citometría de flujo. RM-ANOVA de una vía, n=3 o 4, \* p<0.05

I

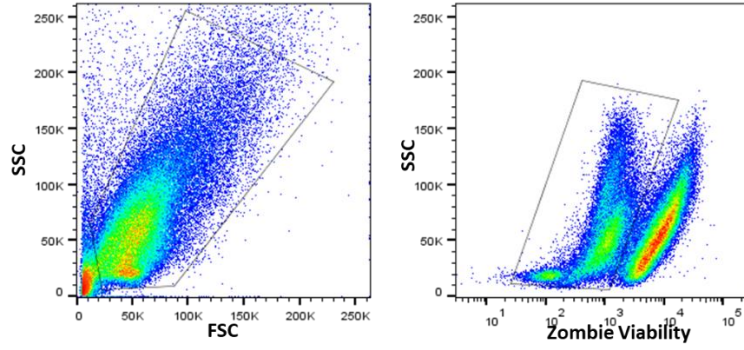
Para evaluar el efecto de las Bregs generadas o inducidas (iBregs) sobre los monocitos, estas fueron cosechadas y co-cultivadas junto a monocitos (Mo) del mismo donante en una razón 4:1 (iBreg: Mo), ya sea manteniendo el contacto entre ambos tipos celulares, o bien, impidiendo el contacto, aunque con intercambio de factores soluble en placa de Transwell (Tw). Al tercer día, se analizó la expresión de las moléculas HLA-DR, CD14, CD86 y TIM-4 en los monocitos mediante citometría de flujo. En la Figura 6 se presenta un esquema de la estrategia experimental empleada, la selección de las poblaciones celulares y el histograma representativo de la expresión de HLA-DR en los monocitos luego del co-cultivo iBregs:Mo, de manera de normalizar los resultados y evidenciar las diferencias entre condiciones, se calculó un porcentaje de inhibición en porcentaje, dado por la MFI de la expresión de HLA-DR en monocitos cultivados en presencia de células B o iBregs, con relación a la MFI de HLA-DR de monocitos cultivados en ausencia de linfocitos B.

La figura 7 muestra la estrategia de selección de los monocitos (*gating*) en base a la expresión de CD14 e histogramas de la expresión de las moléculas HLA-DR, CD14, CD86 y TIM-4 en monocitos luego del co-cultivo con iBregs o células B sin estimular.

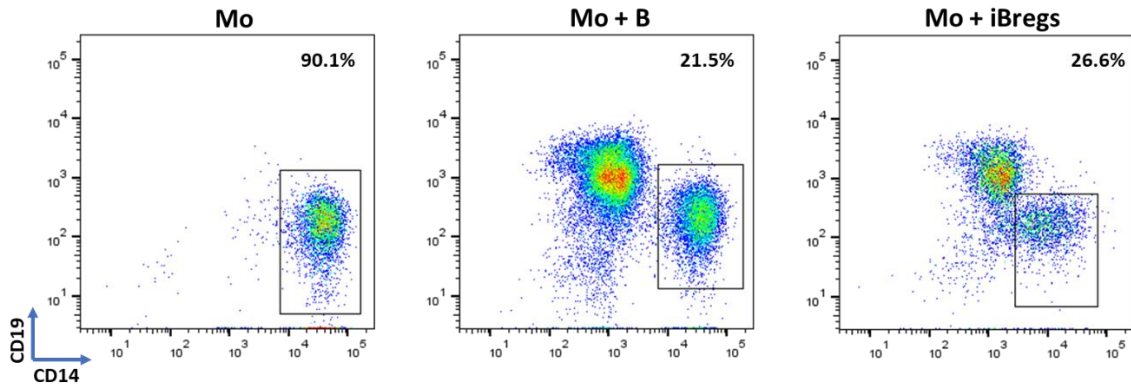


**Figura 6. Esquema de estrategia experimental y análisis de datos.** A partir de linfocitos B aislados, se indujeron iBregs mediante la estimulación del BCR y el TLR-9 durante 48 horas. Los linfocitos B y los iBregs fueron cosechados y junto a Monocitos (Mo) se realizaron co-cultivos en condiciones contacto dependiente y contacto independiente (Transwell) en una relación 4:1 (B/iBreg: Mo), pasadas 72 se cosecharon las células, se tiñeron para marcadores de superficie y se visualizaron mediante citometría de flujo (FC). En el análisis se consideraron las células vivas, negativas para la sonda de viabilidad y se estudiaron los marcadores CD14, CD86, TIM-4 y HLA-DR sobre la población de monocitos CD14+, los valores del MFI de estas moléculas en los monocitos co-cultivados fueron normalizados con el MFI en monocitos sin co-cultivar calculando el porcentaje de inhibición de la molécula blanco.

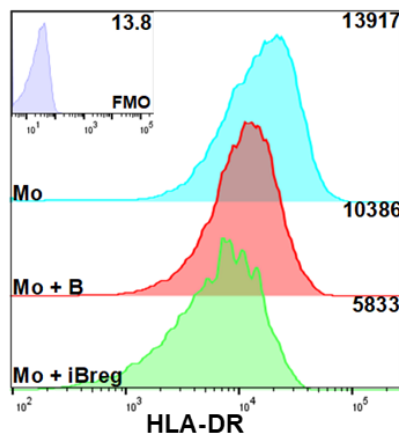
**A**



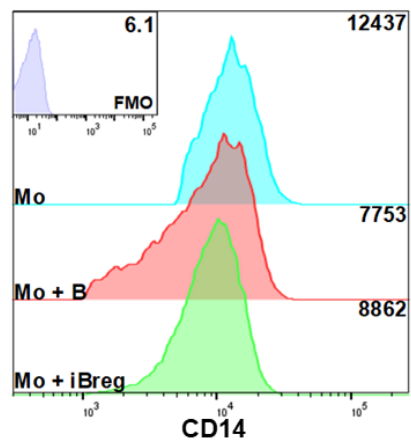
**B**



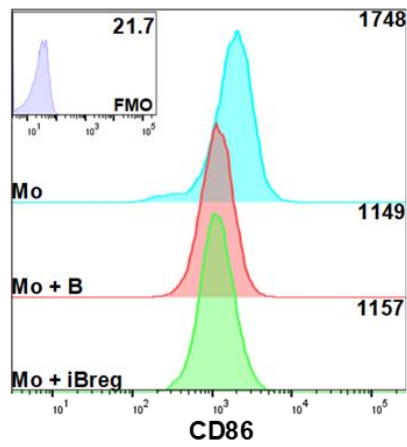
**C**



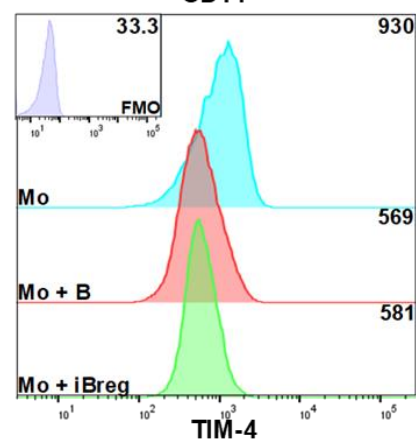
**D**



**E**

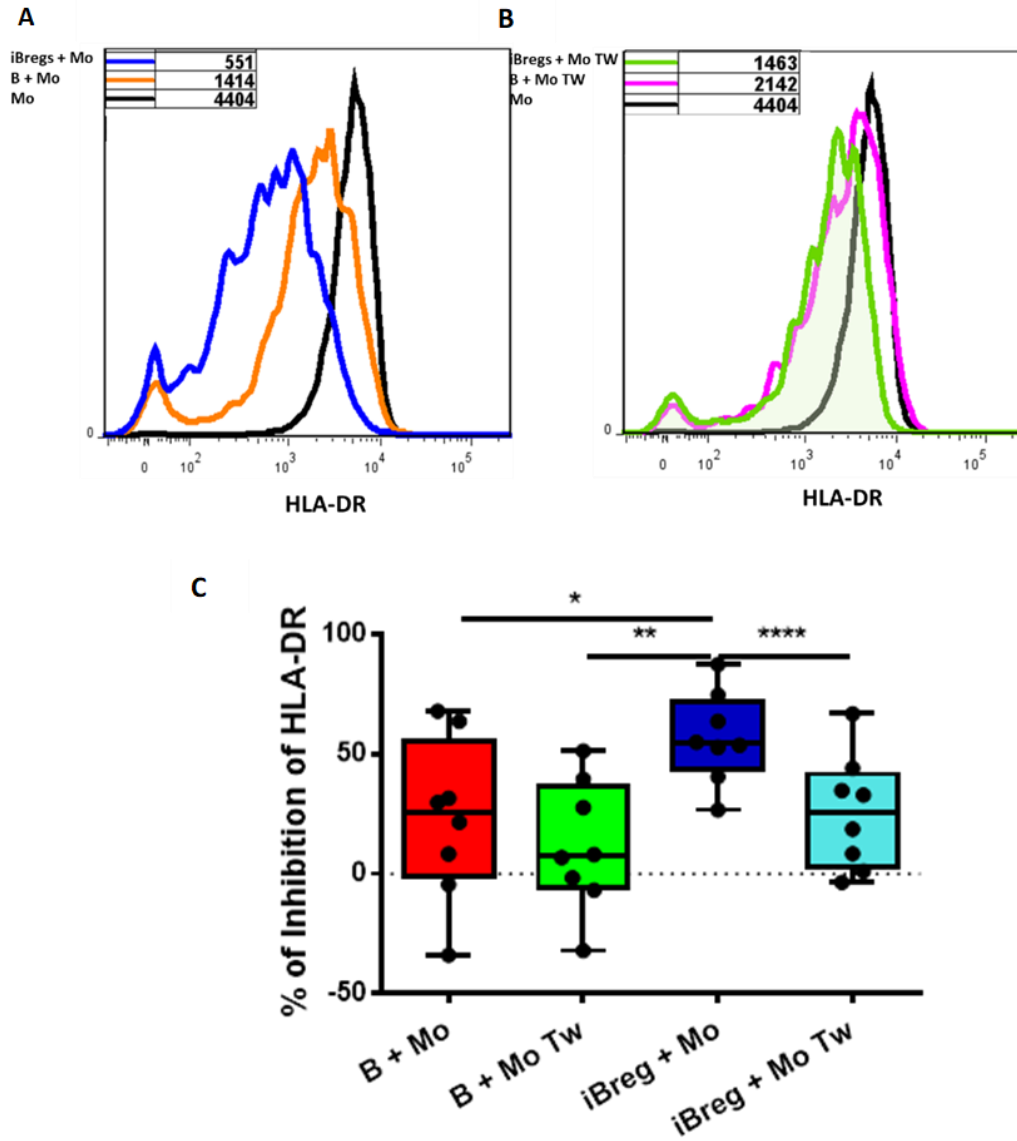


**F**



**Figura 7. Estrategia de *gating* y *dot-plots* representativos.** A) *Dot-plots* representativo para la evaluación de células vivas negativas para la sonda *zombie*, cosechadas luego de 72 horas de cultivo. B) *Gating* de Monocitos CD14<sup>+</sup> a partir de células vivas. C-F) Histogramas representativos de la expresión de C) HLA-DR, D) CD14, E) CD86 y F) TIM-4 en monocitos (celeste), monocitos co-cultivados con linfocitos B (rojo) o iBregs (verde). Gráficos representativos de 6 experimentos independientes. FMO= *Fluorescence minus one*

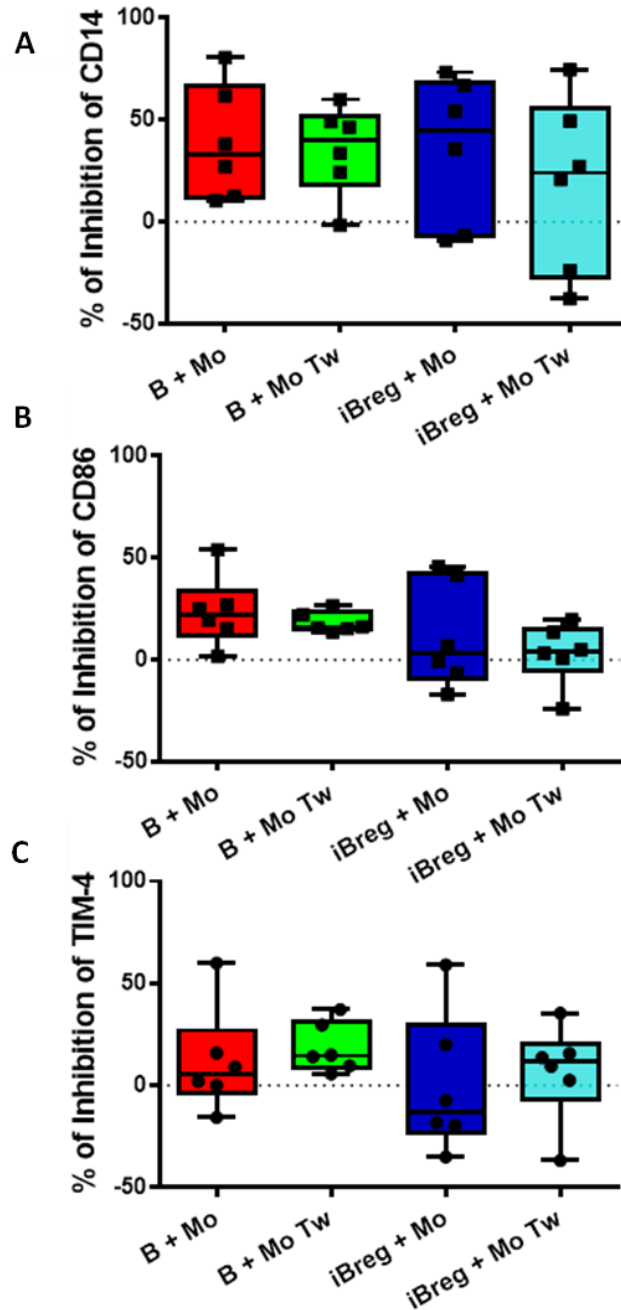
En la Figura 8A, se puede observar un histograma representativo en donde se evidencia que los iBregs son capaces de inhibir la expresión de la molécula de presentación antigénica humana HLA-DR en monocitos en mayor medida que las células B sin estimular. Para evaluar si el efecto inhibitorio observado fue debido a factores solubles secretados por los linfocitos o dependiente del contacto entre ambos tipos celulares se realizaron los co-cultivos de ambos en placas Tw, sistema que permite cultivar dos tipos celulares previniendo el contacto entre ellos, estas cámaras poseen poros de 0.4µm permitiendo el traspaso solo de factores solubles. Como podemos observar hay una disminución en la intensidad de fluorescencia media (MFI) del HLA-DR en los monocitos en presencia de iBregs, pero en menor magnitud que en placas normales (Figura 8B). En la figura 8C podemos observar que el efecto inhibitorio es mayor en los monocitos cuando fueron co-cultivados con iBregs y que su efecto regulador sobre monocitos es dependiente de contacto, ya que dicho efecto inhibitorio disminuyó significativamente cuando se realizaron los co-cultivos de ambos tipos celulares cuando no restringió el contacto entre las iBregs y los monocitos. Al evaluar la inhibición de la expresión de las moléculas CD14, CD86 y TIM-4 expresadas en la superficie de los monocitos se observó una inhibición en la expresión en dichas las moléculas, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas (Figura 9).



**Figura 8. Efecto de los iBregs sobre la expresión de HLA-DR en monocitos.**

Monocitos (Mo) fueron co-cultivados por 72hrs en condiciones contacto dependiente y contacto independiente en presencia de linfocitos B o iBregs, la expresión de HLA-DR fue evaluada mediante citometría de flujo. A) Histograma representativo de co-cultivos en placa normal, B) Histograma representativo de co-cultivo en placa Transwell Tw. C) Gráfico de inhibición de la expresión de HLA-DR. RM-ANOVA de una vía, n=6; \* p<0.05

\*\*p<0.01 \*\*\*\*p<0.0001



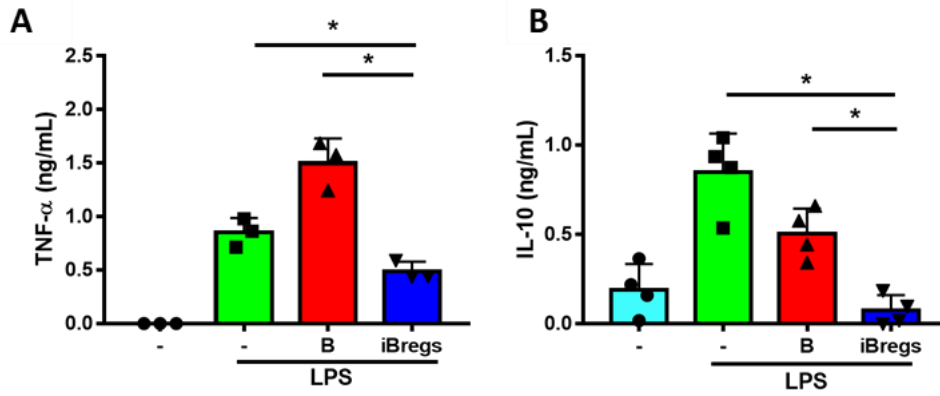
**Figura 9. Efecto de los iBregs sobre la expresión de CD14, CD86 y TIM-4 en monocitos.** Monocitos (Mo) co-cultivados por 72hrs en condiciones contacto dependiente y contacto independiente en presencia de linfocitos B o iBregs, la expresión de A) CD14, B) CD86 y C) TIM-4 fue evaluada mediante citometría de flujo. RM-ANOVA de una vía, n=6.



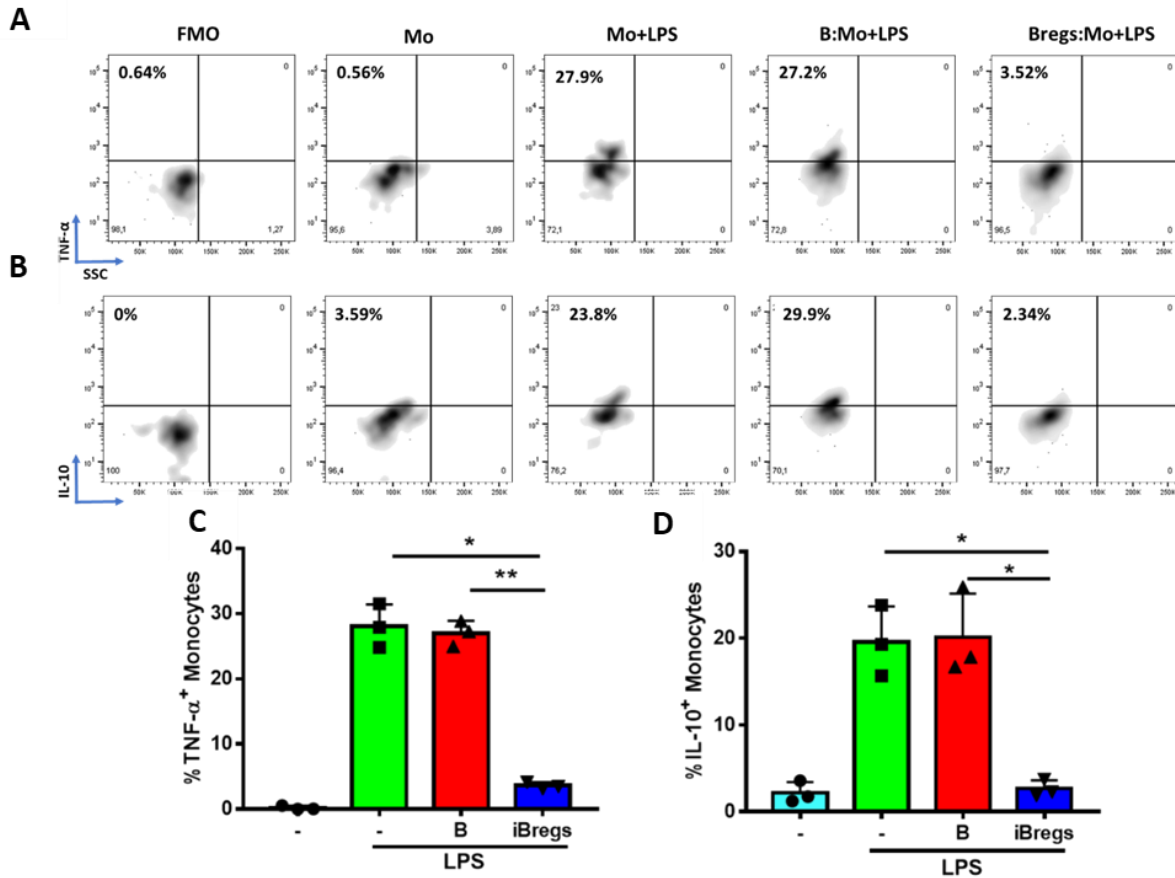
Por otro lado, se quiso evaluar si las iBregs junto con inhibir la expresión de HLA-DR, alteran la capacidad funcional de los monocitos, evaluado en base a su capacidad de responder a la estimulación del TLR4. Para ello, los monocitos recuperados desde los co-cultivos Tw, fueron estimulados por 24 horas con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) ligando del TLR4, posteriormente se determinó la concentración de las citoquinas TNF-alpha e IL-10 en el sobrenadante de cultivo mediante la técnica de ELISA. Se observó que los monocitos que fueron cultivados con iBregs, secretan niveles significativamente menores de TNF-alpha e IL-10 en respuesta a LPS, que aquellos que fueron cultivados en presencia de linfocitos B sin estimular, o bien, monocitos estimulados solo con LPS (Figura 10).

Para determinar el efecto de las iBregs sobre la capacidad funcional de los monocitos mediado por contacto, se propuso recuperar los co-cultivos de iBregs:Mo, o bien, B:Mo para posteriormente evaluar la capacidad de secreción de citoquinas de los monocitos frente al estímulo del TLR4, sin embargo, esto no fue posible ya que al resuspender para recuperar los monocitos los sobrenadantes los resultados obtenidos no fueron consistentes, debido a que este procedimiento fue es altamente variable por el arrastre de los linfocitos B entre experimentos, evidenciado por la presencia de dichas células analizadas por citometría de flujo. Para poder responder nuestra pregunta y evitar este ruido experimental, cambiamos la estrategia y analizamos mediante citometría de flujo la expresión intracelular de las citoquinas en los monocitos, lo cual nos permite evitar el efecto de los linfocitos B que obteníamos en los ELISAs. En la Figura 11 observamos que existe una menor frecuencia de monocitos positivos a TNF-alpha e IL-10

provenientes de los co-cultivos con linfocitos Bregs en comparación a los co-cultivos con linfocitos B, o a los monocitos solos. En conjunto estos resultados indican que los linfocitos B reguladores inducidos son capaces de inhibir la función de los monocitos, independiente si existe un contacto entre estos 2 tipos celulares. Lamentablemente, como se utilizaron 2 técnicas distintas para abordar esta interrogante no fue posible comparar si la inhibición contacto dependiente es mayor que la inhibición mediada solo por factores solubles.



**Figura 10 Evaluación de la capacidad de los iBregs de alterar la función de los Monocitos mediante factores solubles.** Monocitos obtenidos desde co-cultivos Transwell con linfocitos B o iBregs fueron estimulados por 24 hrs con LPS, el sobrenadante fue recuperado y se evaluó la secreción de A) TNF- $\alpha$  e B) IL-10 mediante ELISA. RM-ANOVA de una vía, n=4 \* p<0.05



**Figura 11. Evaluación de la capacidad de los iBregs de alterar la función de los Monocitos en cultivos convencionales.** Monocitos obtenidos desde co-cultivos convencionales con linfocitos B o iBregs fueron estimulados por 24 hrs con LPS con adición de PIB las últimas 5 horas de cultivo, se evaluó mediante citometría de flujo intracelular la expresión TNF- $\alpha$  e IL-10 en las células CD14. A) y B) Density plots representativos de la frecuencia de monocitos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> respectivamente; C) y D) Gráficos acumulados de 3 cultivos independientes de la frecuencia de monocitos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>. PIB: PMA, Ionomicina y Brefeldina A. RM-ANOVA de una vía, n=3 \* p<0.05 \*\* p<0.01.

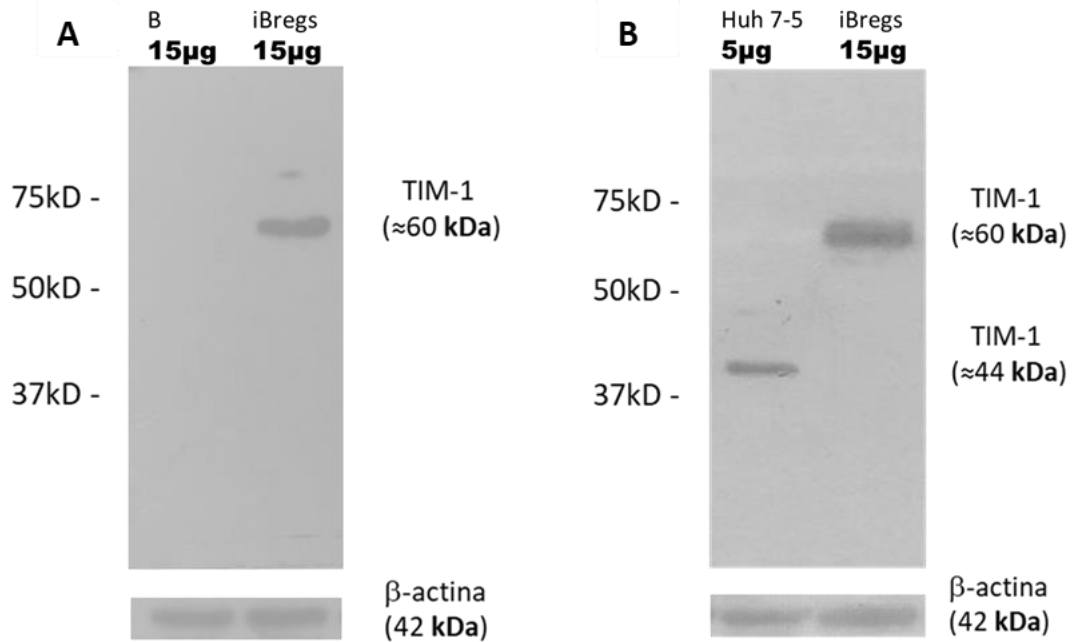
**Objetivo Específico 2 Determinar el efecto regulador de las moléculas TIM-1 y PD-1 con sus ligandos TIM-4 y PD-L1/PD-L2, respectivamente, en la interacción de linfocitos B reguladores con monocitos**

Dado que observamos una disminución significativa en la expresión de HLA-DR en monocitos cultivados en presencia de iBregs, la cual estaría siendo mediada de manera contacto dependiente, es necesario determinar las moléculas involucradas en dicho fenómeno. Para ello, la propuesta original de este proyecto buscaba por un lado develar el rol de TIM-1 en la interacción con monocitos, por lo que se propuso el uso de anticuerpos bloqueantes del receptor TIM-1 (anti-TIM1, clon 1D12). Como podemos observar en la Figura 23 (Anexo), no fue posible obtener información de los monocitos en el co-cultivo con células iBregs o células B mediante citometría de flujo, puesto que hubo una baja o nula frecuencia de estos al final de las 72 horas de cultivo en presencia de anti-TIM-1 (columna central), o en otros casos una caída drástica en la expresión de HLA-DR en presencia del anticuerpo utilizado, además se comprobó que el isotipo del anticuerpo generaba el mismo efecto (no mostrado en la figura), aparentemente debido a la presencia de endotoxinas y azida en reactivos no aptos para cultivo celular debido a la no disponibilidad en el mercado de un anti-TIM-1 diseñado para este fin. Sin embargo, al utilizar el isotipo diseñado para cultivos, no se observó cambio alguno (Figura no mostrada), comprobando con ello la aseveración anterior, por lo cual nos impidió su uso para descifrar este objetivo.

Para poder abordar este objetivo y ante la carencia de inhibidores químicos específicos para este receptor, utilizamos RNA de interferencia para TIM-1 (si-RNA), de manera que inhibir la expresión de TIM-1 en las células iBregs, evaluar su capacidad de secreción de IL-10 y su capacidad para inhibir la función de los monocitos. Alternativamente, evaluamos los efectos de la línea celular Huh7.5, que expresa TIM-1 (85), y su versión silenciada, sobre monocitos.

Utilizamos la técnica estándar para detectar el silenciamiento génico a nivel de expresión de la proteína blanco, Western Blot (WB), por lo que primero se debió estandarizar la detección de TIM-1 en las células a utilizar, para ello se extrajo las proteínas totales de los linfocitos B e iBregs, paralelamente a modo de control positivo se extrajo las proteínas totales de la línea celular Huh7.5. Como podemos observar en la figura 12B se identificó una banda con un peso molecular cercano a los 44 kiloDalton (kDa) para la línea celular y otra banda a los 60kDa en los iBregs, estas bandas coinciden con los pesos moleculares esperables según el fabricante del anticuerpo, estas diferencias entre ambos valores se explican por modificaciones postraduccionales propias de TIM-1 en cada tipo celular. No se logró detectar TIM-1 en linfocitos B sin estimular a la concentración utilizada (Figura 12A)

Una vez identificada TIM-1 por WB se procedió a establecer un protocolo de silenciamiento génico. La propuesta de silenciamiento génico de un cultivo primario presentó un gran desafío, esto debido al limitado número de linfocitos B que se obtienen por muestra, a la disminución de la viabilidad por las técnicas y a la posible activación de las células B al ser sometidas a los procedimientos y/o reactivos para transfección.

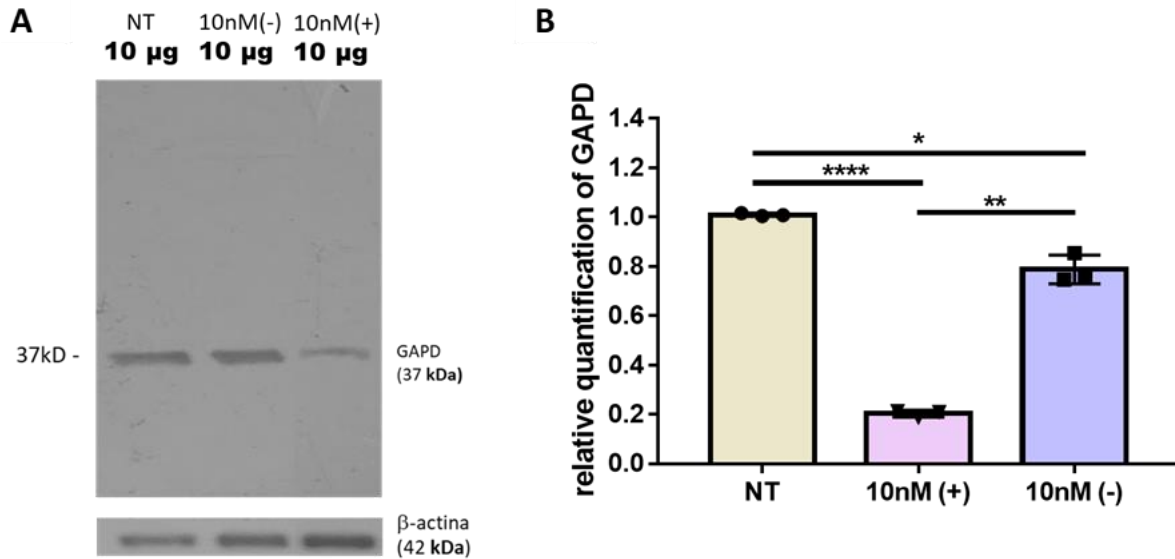


**Figura 12. Expresión de TIM-1 en Huh 7.5, Linfocitos B e iBregs detectada mediante Western Blot.** A) Identificación de TIM-1 en extracto proteico total linfocitos B y linfocitos B reguladores inducidos. B) Identificación de TIM-1 en extracto proteico total de la línea celular Huh 7.5 y en linfocitos B reguladores inducidos. Se utilizó en ambos casos β-actina como control de carga.

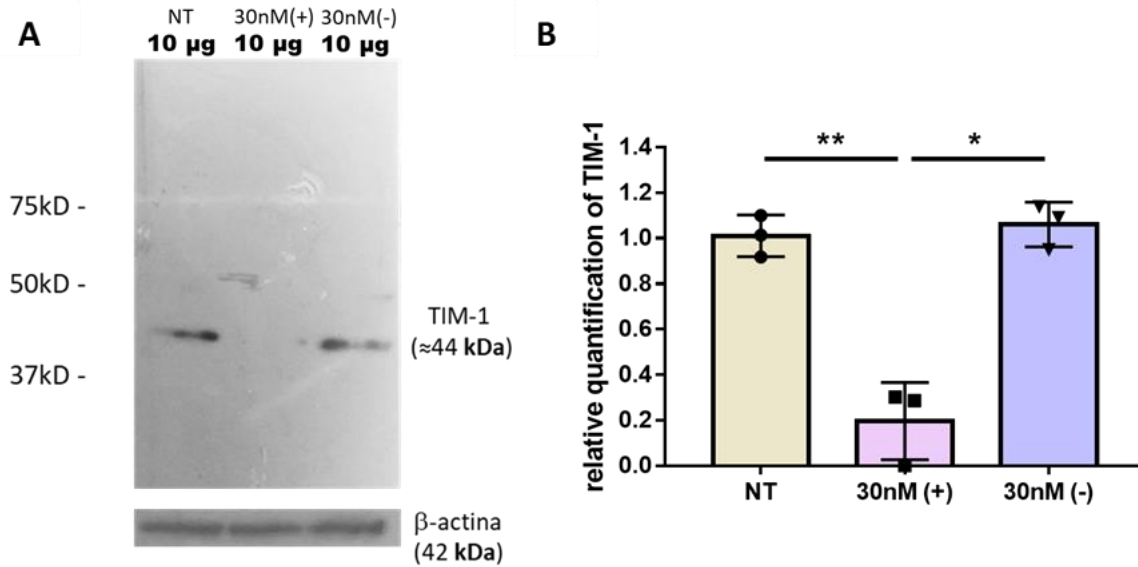


Para evitar esto, en base a la literatura revisada se implementó la técnica de Magnetofección, técnica menos agresiva que la clásica electroporación y el uso de lipofectamina(86,87). Esta técnica utiliza nanopartículas magnéticas que se asocian al siRNA y que son agregadas a los cultivos mientras este se encuentra sometido a un campo magnético constante. La incorporación del siRNA a la célula ocurre finalmente por pinocitosis, afectando mínimamente la viabilidad celular.

Para estandarizar el protocolo de silenciamiento se utilizó la línea celular Huh7.5 silenciando inicialmente el gen control GAPD, ya que presenta altos niveles de expresión y su silenciamiento no es crítico para la viabilidad celular. Para silenciar GAPD y TIM-1 se utilizó un pool de 4 siRNA, que aumentan la potencia y efectividad. En la Figura 13, observamos que fue posible silenciar significativamente la expresión de GAPD en la línea celular Huh7.5 en comparación al control negativo, un pool de 4 siRNA sin blanco en el genoma humano, lo que nos permitió estandarizar y validar la efectividad de la técnica escogida y continuar con el silenciamiento de TIM-1. En la Figura 14 podemos observar que fuimos capaces de silenciar significativamente la expresión de TIM-1 en la línea Huh7.5 (columna central del WB), este silenciamiento transitorio de TIM-1 nos da la posibilidad de probar alternativamente el efecto de TIM-1 en los monocitos y evaluar el comportamiento de estos últimos ante la ausencia de TIM-1 en su interacción con la línea celular.



**Figura 13. Silenciamiento de GAPD en Huh 7.5.** La expresión de GAPD en la línea celular Huh 7.5 fue silenciada mediante Magnetotransfección de siRNA. A) Western Blot representativo B) Cuantificación relativa de la expresión de GAPD, gráfico cumulativo de 3 experimentos independientes. NT: no transfectado, (+) = *ON-TARGETplus GAPD Pool*, (-) *ON-TARGETplus Non-targeting Pool*; RM-ANOVA de una vía, n=3, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001.

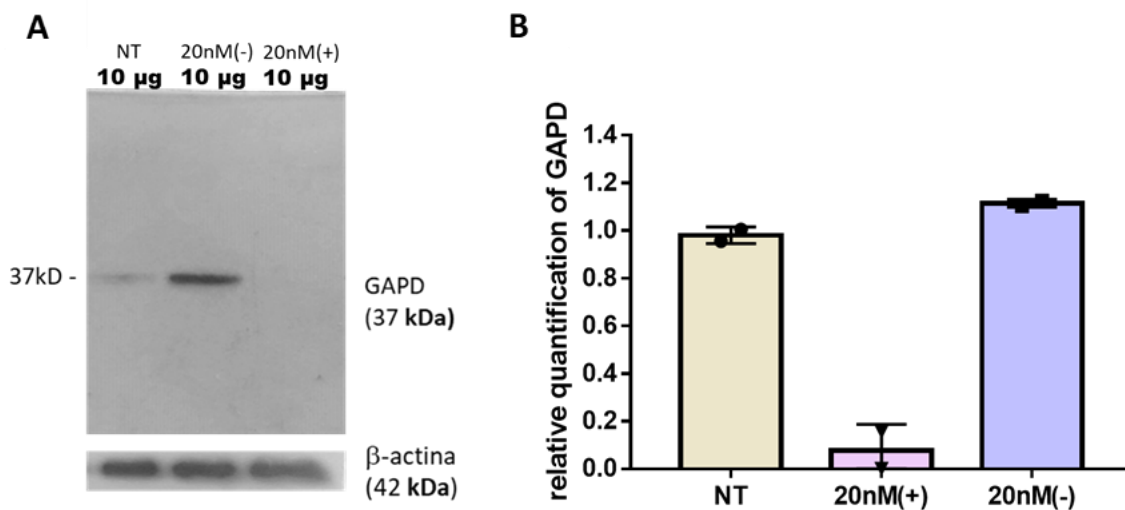


**Figura 14. Silenciamiento de TIM-1 en Huh 7.5.** La expresión de TIM-1 en la línea celular Huh 7.5 fue silenciada mediante Magnetotransfección de siRNA, A) Western Blot representativo B) Cuantificación relativa de la expresión de TIM-1, grafico cumulativo de 3 experimentos independientes. NT: no transfectado, (+) = ON-TARGETplus TIM-1 Pool, (-) ON-TARGETplus Non-targeting Pool. RM-ANOVA de una vía, n=3, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

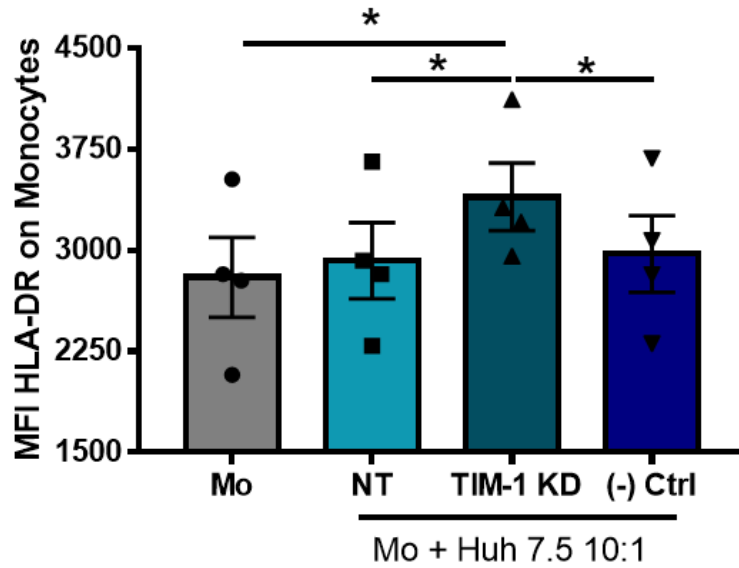
Una vez establecido el protocolo de silenciamiento se procedió a silenciar GADP y TIM-1 en linfocitos B, sin embargo, se presentaron diferentes dificultades al momento de replicar el protocolo utilizado en la línea celular Huh7.5. Los linfocitos B son células no adherentes cuya viabilidad se ve afectada al ser cultivadas en placas de fondo plano, condición necesaria para el silenciamiento para esta técnica; se necesitaba un número elevado de linfocitos B para iniciar el silenciamiento y obtener un número suficiente de células a las 48 horas de cultivo para extraer una concentración de proteínas suficiente y poder visualizar por WB, lo cual se vio dificultado por la escasez de muestras provenientes del banco de sangre durante el último periodo de desarrollo de este objetivo, además se debió ajustar la concentración de siRNA para cada condición. Finalmente se logró silenciar GADP en los linfocitos B sin estimular, esto es un resultado importante porque representa el primer silenciamiento génico de linfocitos B mediante magnetofección, Figura 15. Lamentablemente no fuimos capaces de traspasar estos resultados a linfocitos iBregs, ni tampoco al silenciamiento de TIM-1.

Debido a la imposibilidad de silenciar TIM-1 en los linfocitos B, se continuó explorando la estrategia alternativa para abordar este objetivo mediante el uso de la línea Huh7.5, es importante señalar que las líneas celulares de linfocitos B disponibles no expresaban TIM-1, además de que no adquieren capacidad reguladora ante la inducción de un perfil regulador. A su vez, el uso de la línea Huh7.5 nos permitiría estudiar el efecto de TIM-1 debido a que logramos exitosamente silenciar TIM-1. Esta línea celular se deriva de hepatoma y sus efectos sobre los monocitos no ha sido estudiados a la fecha, por lo que es relevante conocer si son capaces de generar

respuestas proinflamatorias o antiinflamatorias en los monocitos. Se estandarizó una razón de 1:10 entre Huh7.5: monocitos y los co-cultivos se realizaron durante 48hrs. En la figura 16 podemos observar que la expresión de HLA-DR en los monocitos aumenta significativamente cuando son cultivados con células Huh7.5, por lo que esta línea celular tendría un efecto activador en los monocitos, sorpresivamente cuando el co-cultivo fue realizado con la línea Huh7.5 en la cual su expresión de TIM-1 fue silenciada, la expresión de HLA-DR en los monocitos se vio incrementada, fenómeno no observado en el control negativo de silenciamiento. Este resultado nos sugiere que la ausencia de TIM-1 en la interacción Huh7.5 con monocitos favorecería la activación en los monocitos, por lo que podemos atribuir un rol regulador de TIM-1, en el cual su presencia y su probable interacción con TIM-4, gatillaría una señal antiinflamatoria en los monocitos, en este caso particular compensando la activación mediada por las células Huh7.5. Este resultado podría sugerir que existe un mecanismo regulador contacto dependiente mediado por el eje TIM-1/TIM-4. Este fenómeno, nos podría indicar eventualmente que TIM-1 podría participar en la interacción de Bregs con monocitos a través de TIM-4, que explicaría en parte el fenómeno de inhibición observado en los co-cultivos de ambos tipos celulares permitiendo su contacto.



**Figura 15. Silenciamiento de GAPD en linfocitos B.** La expresión de GAPD en linfocitos B fue silenciada mediante Magnetotransfección de siRNA, A) Western Blot representativo B) Cuantificación relativa de la expresión de GAPD, grafico cumulativo de 3 experimentos independientes. NT: no transfectado, (+) = ON-TARGETplus GAPD Pool, (-) ON-TARGETplus Non-targeting Pool. n=2



**Figura 16. Efecto de Huh 7.5 TIM-1 KD sobre monocitos.** Monocitos (Mo) fueron cultivados solos o en presencia de Huh 7.5: sin transfectar (NT), con Knock Down de TIM-1 mediante transfección de siRNA (TIM-1 KD) o transfectados con siRNA sin blanco ((-) Ctrl), todos en razón 10:1. Se evaluó la expresión de HLA-DR a las 48 horas de cultivo. RM-ANOVA de una vía, n=4; \* p<0.05

Otro de los mecanismos posibles ejercidos por los Bregs sobre monocitos es el eje PD-1/PD-L1, dado que estos expresan PD-1 y se ha demostrado que la activación de PD-1 por sus ligandos induce la secreción de IL-10, pudiendo actuar en nuestro diseño experimental de forma autocrina (88). Favorablemente, la gran relevancia de este *checkpoint* en los linfocitos T y como moléculas blanco en el tratamiento del cáncer, nos permitió acceder a anticuerpos de bloqueo diseñados para cultivo celular sin afectar la viabilidad de los monocitos. Como observamos anteriormente en la figura 3, la expresión de PD-1 y PD-L1 se ve incrementa significativamente en las iBregs, por lo que se procedió a utilizar anticuerpos bloqueantes para ambas moléculas antes de cultivarlos con los monocitos. Pasado 72 horas de co-cultivo de iBregs:Mo, se evaluó la expresión de HLA-DR en los monocitos, molécula que según lo observado en la figura 6 se ve afectada por la inhibición contacto dependiente de las iBregs. La Figura 16, muestra que el bloqueo de PD-L1 en los iBregs disminuye parcial pero significativamente la inhibición de la expresión de HLA-DR en comparación a los iBregs sin tratar, aproximándose a la respuesta de los monocitos frente a iBregs en condiciones de Tw. No se observaron diferencias con el uso del anticuerpo bloqueante de PD-1, ni en el isotipo correspondiente. Este resultado implica que el aumento de PD-L1 observado en los iBregs cumple una función relevante en el efecto regulador ejercido sobre los monocitos, este mecanismo trabajaría en conjunto con TIM-1 y las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF-B para inhibir la función de los monocitos y su capacidad de responder ante estímulos proinflamatorios.



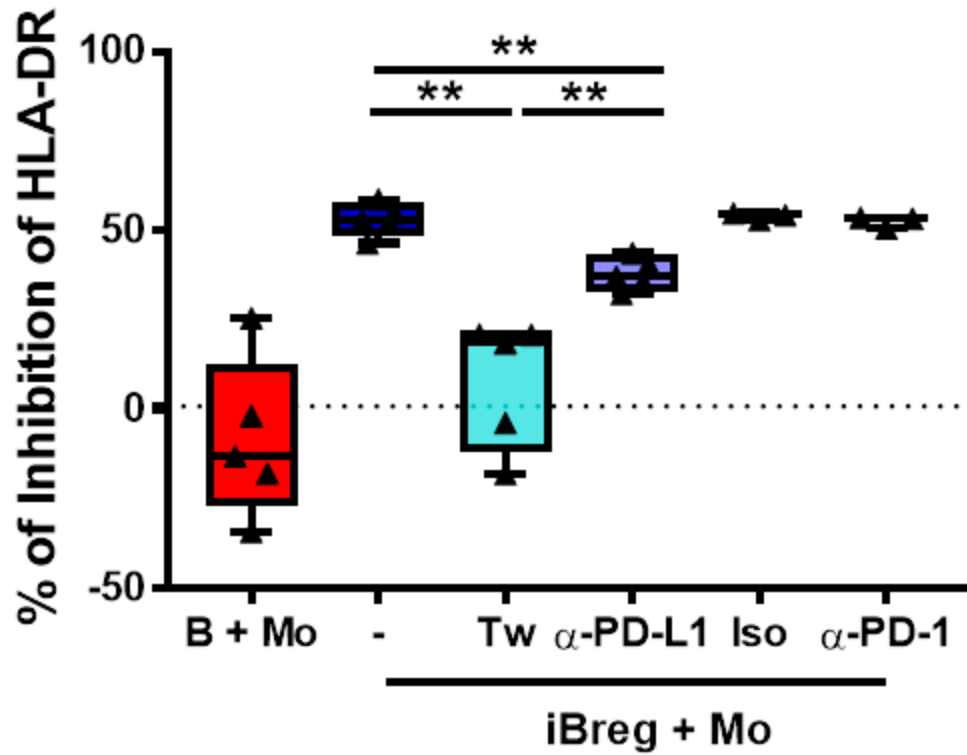


Figura 17. Efecto del bloqueo del eje PD-1/PD-L1 en la inhibición de HLA-DR en monocitos mediada por iBregs. Monocitos (Mo) fueron co-cultivados por 72hrs en condiciones contacto dependiente y contacto independiente con iBregs previamente incubados con anticuerpos bloqueantes contra PD-1 y PD-L1, la expresión de HLA-DR fue evaluada mediante citometría de flujo., RM-ANOVA de una vía, n=4; \*\* p<0.01.

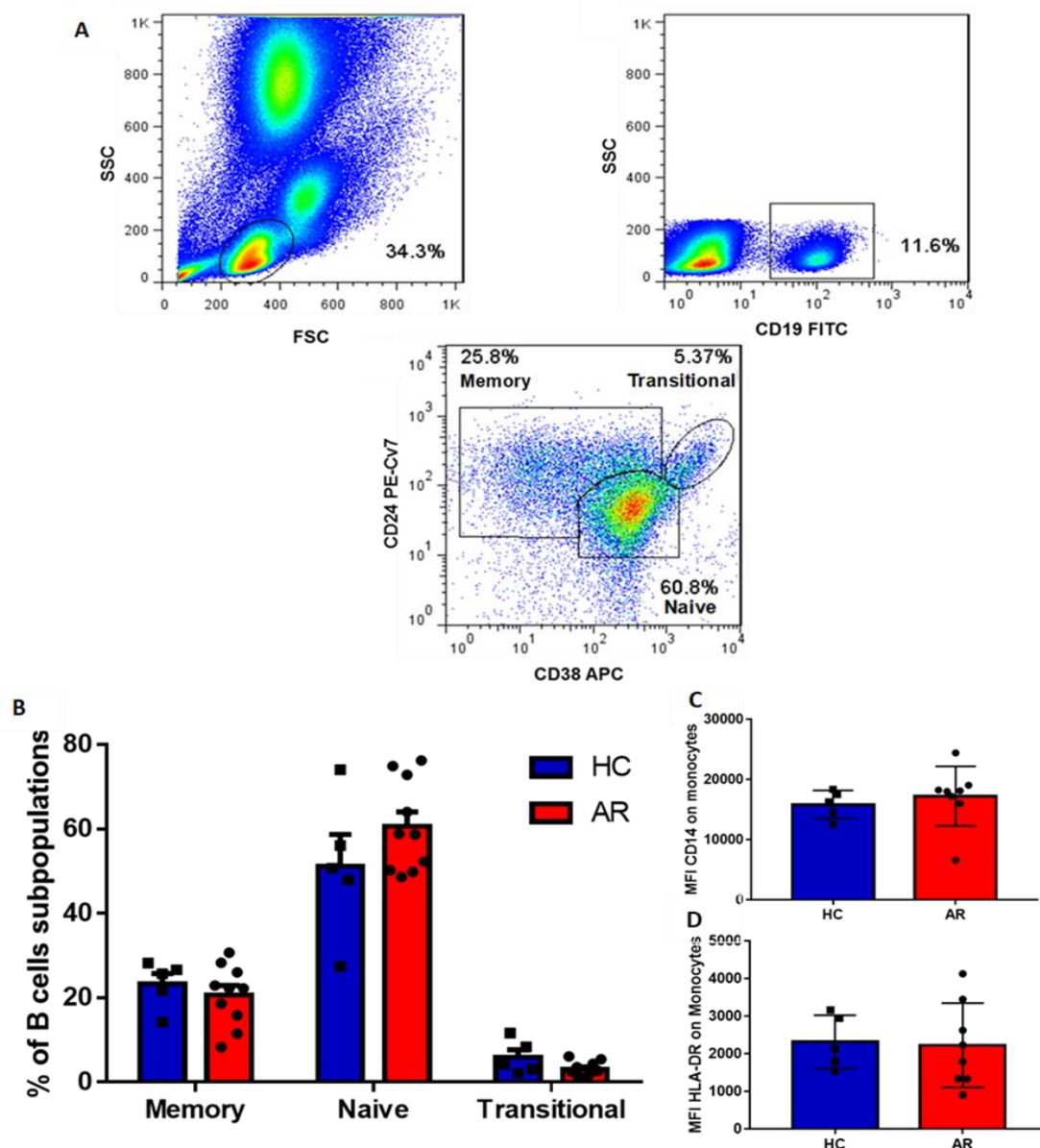
**Objetivo Específico 3. Determinar alteraciones en la comunicación del eje TIM-1/TIM-4 y PD-1/PD-L1 y PD-L2 entre linfocitos B reguladores y monocitos de pacientes con Artritis Reumatoide.**

Este objetivo comprende estudiar alteraciones en la interacción de los linfocitos B con monocitos de pacientes con Artritis Reumatoide (AR), en relación a controles sanos, que pudiesen contribuir a explicar su participación en la pérdida de la tolerancia. Para llevar a cabo este objetivo, previa firma del consentimiento informado se extrajo mediante punción venosa 60 ml de sangre periférica de pacientes con AR, y mediante los kits antes mencionados se purificaron linfocitos B y monocitos. En la tabla I se resume los datos de los pacientes reclutados. Se evaluó la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B en base a la expresión de las moléculas CD19, CD24 y CD38, ya sea; virgen ( $CD19+CD24^{hi}CD38^{med}$ ), memoria ( $CD19+CD24^{med}CD38^{med}$ ), y transicional ( $CD19+CD24^{hi}CD38^{hi}$ ), además se evaluó la expresión de las moléculas CD14, HLA-DR, CD86 y TIM-4 en los monocitos provenientes de sangre periférica de los pacientes con AR, el fenotipo de ambos tipos celulares se comparó con células obtenidas de controles sanos (Figuras 18 y 21). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con AR y controles sanos. A su vez, se observó que monocitos de pacientes, la expresión de HLA-DR y de CD14 no presenta diferencias en comparación a controles sanos. A continuación, se realizaron co-cultivos de células B, iBregs y monocitos, descritos anteriormente en el objetivo 1, observando que los linfocitos B sin estimular, inducen la expresión de HLA-DR y de CD86 en monocitos provenientes de donantes con AR (Figura 19), dada por un valor menor a 0 en el porcentaje de

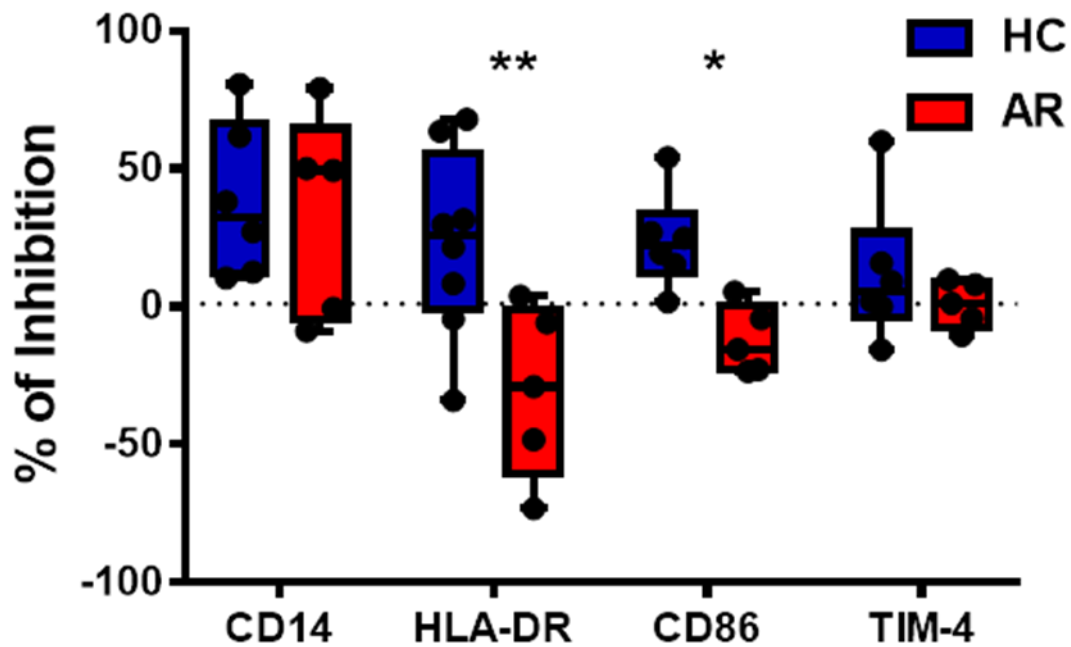
inhibición, efecto opuesto al ocurrido en los co-cultivos de células de controles sanos (en azul), donde observamos que existe una inhibición positiva de la expresión de dichas moléculas en los monocitos como se había demostrado anteriormente. En tanto, el comportamiento de la expresión de CD14 y TIM-4 en monocitos que fueron cultivados en presencia de linfocitos B sin estimular, si bien, existe una menor capacidad de inhibición de los linfocitos B de pacientes con AR con relación a células B de controles sanos, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas, posiblemente debido a la alta dispersión de datos.

<b>Criterio</b>	<b>Pacientes n=11</b>
Edad (años)	51.1 ±14.7
Sexo M/F	1/10
DAS28	4.41 ±1.51
Factor Reumatoideo (+/-)	9/2

**Tabla 2. Resumen de los datos de los pacientes con Artritis Reumatoide reclutados**



**Figura 18. Caracterización de linfocitos B y monocitos en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide y de controles sano. A) Estrategia de selección de subpoblaciones de linfocitos B; B) Frecuencia de subpoblaciones de linfocitos B; C) Expresión de CD14 en superficie de monocitos; D) Expresión de HLA-DR en superficie de monocitos. t test no pareados, n=10 para AR y n=5 para HC en B, n=8 para AR y n=5 para HC en C y D.**



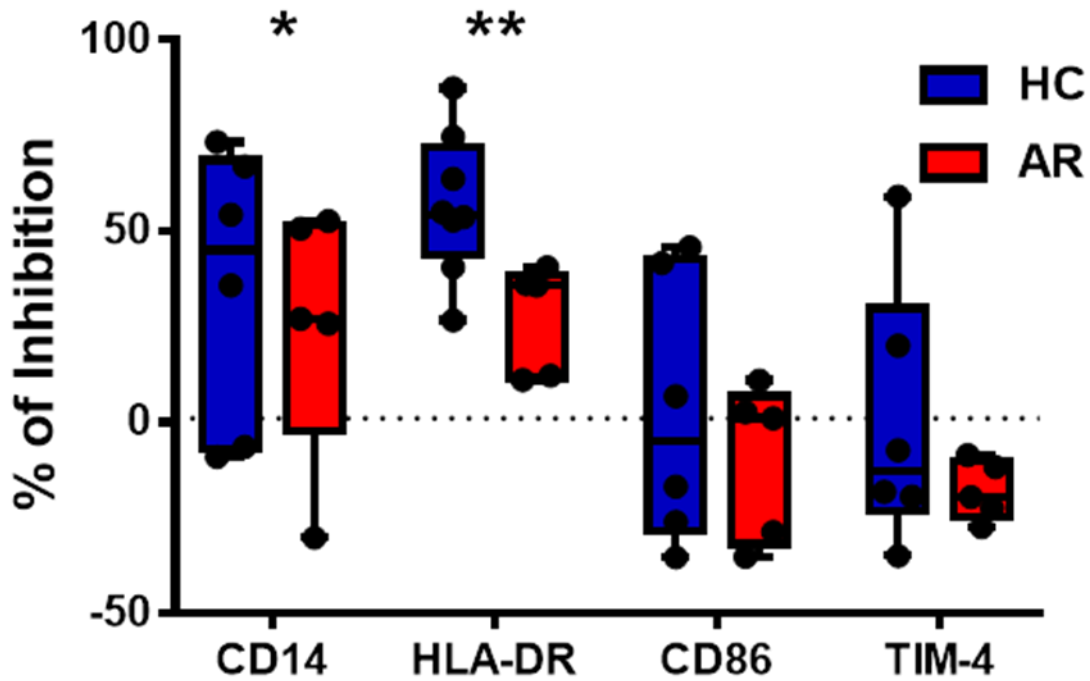
**Figura 19. Comparación de la capacidad de linfocitos B de alterar el fenotipo de los monocitos de pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.** Monocitos de pacientes con AR y controles sanos, fueron aislados y co-cultivados con linfocitos B de manera autóloga durante 72hrs, posteriormente se evaluó la expresión de CD14, HLA-DR, CD86 y TIM-4 en superficie de los monocitos mediante citometría de flujo. t test no pareado, n=5 para AR y n=6 para HC, \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

En este mismo sentido, al estudiar la capacidad reguladores de los iBregs provenientes de pacientes con AR, se observó que los iBregs tanto de pacientes con AR y controles sanos, son capaces de inhibir la expresión de CD14 y de HLA-DR en monocitos (Figura 20), sin embargo, las iBregs de controles sanos inhibe de manera significativamente mayor que los iBregs de pacientes con AR. Al igual que las iBregs de controles sanos, las iBregs de pacientes con AR poseen la capacidad de inhibir la expresión de CD86 y TIM-4, sin embargo, no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de dichas moléculas entre monocitos derivados de pacientes y controles sanos.

Establecida la existencia de alteraciones en la regulación por parte de las iBregs de pacientes con AR sobre monocitos, se evaluó si existen posibles deficiencias en las interacciones dependiente de contacto entre ambos tipos celulares. Como mecanismo propuesto en este proyecto, se postula la participación de TIM-1 y sus ligandos, por ello que se evaluó la frecuencia de linfocitos B TIM-1+ de sangre periférica de donantes sanos y de pacientes con AR. Se observó que los pacientes con AR presentan una menor frecuencia de linfocitos B TIM-1+ en comparación a controles sanos. (Figura 21A). Por otra parte, hay que recordar que uno de los ligandos naturales de TIM-1 es TIM-4, por lo que evaluamos su expresión en monocitos de pacientes con AR y controles sanos, observando que los monocitos de pacientes con AR, caracterizados por la expresión de CD14+ en superficie, presentan una menor expresión de TIM-4 en comparación a las células CD14+ de controles sanos (Figura 21B). Además, se evaluó la expresión de TIM-1+ en los iBregs, representada como porcentaje de células B TIM-

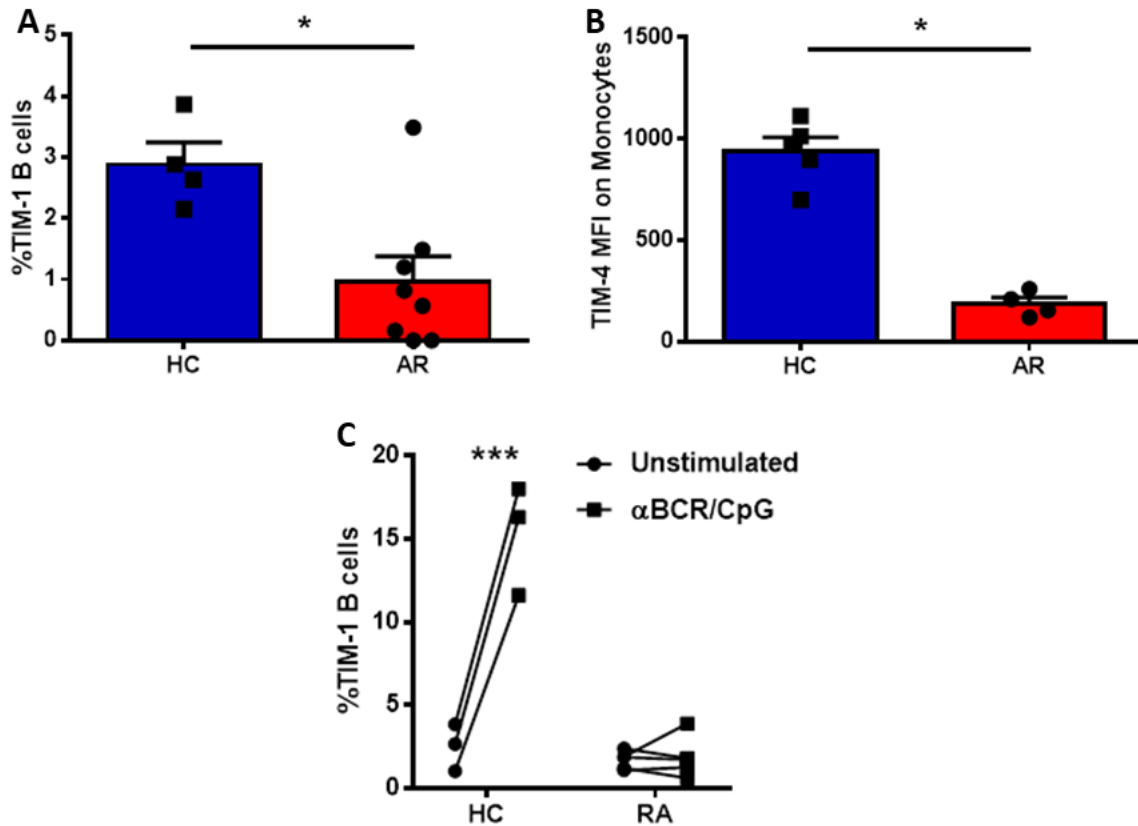
1 posterior al estímulo inductor de iBregs ( $\alpha$ BCR/CpG), tanto en células de pacientes con AR y controles sanos, evidenciando que las células B de pacientes con AR poseen una alteración en su capacidad para inducir iBregs, dado que no se observa un aumento en la frecuencia de linfocitos B TIM-1+ en respuesta al estímulo, a diferencia de las células B provenientes de controles sanos, en donde se observó un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de iBregs (Fig. 21C).

El otro mecanismo de regulación de las iBregs propuesto involucra el eje PD-1 y sus ligandos, por lo que se evaluó frecuencia de linfocitos B positivos para PD-1, PD-L1 y PD-L2 en sangre periférica de pacientes con AR, en donde no se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles sanos (Figura 22A). Finalmente se evaluó la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las células B de pacientes con AR y controles sanos posterior a la estimulación inductora de iBregs, como se observa en las figuras 22B-D, no hubo diferencias en la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 posterior al estímulo inductor de iBregs, aunque el tamaño muestral es limitado para poder establecer una norma.

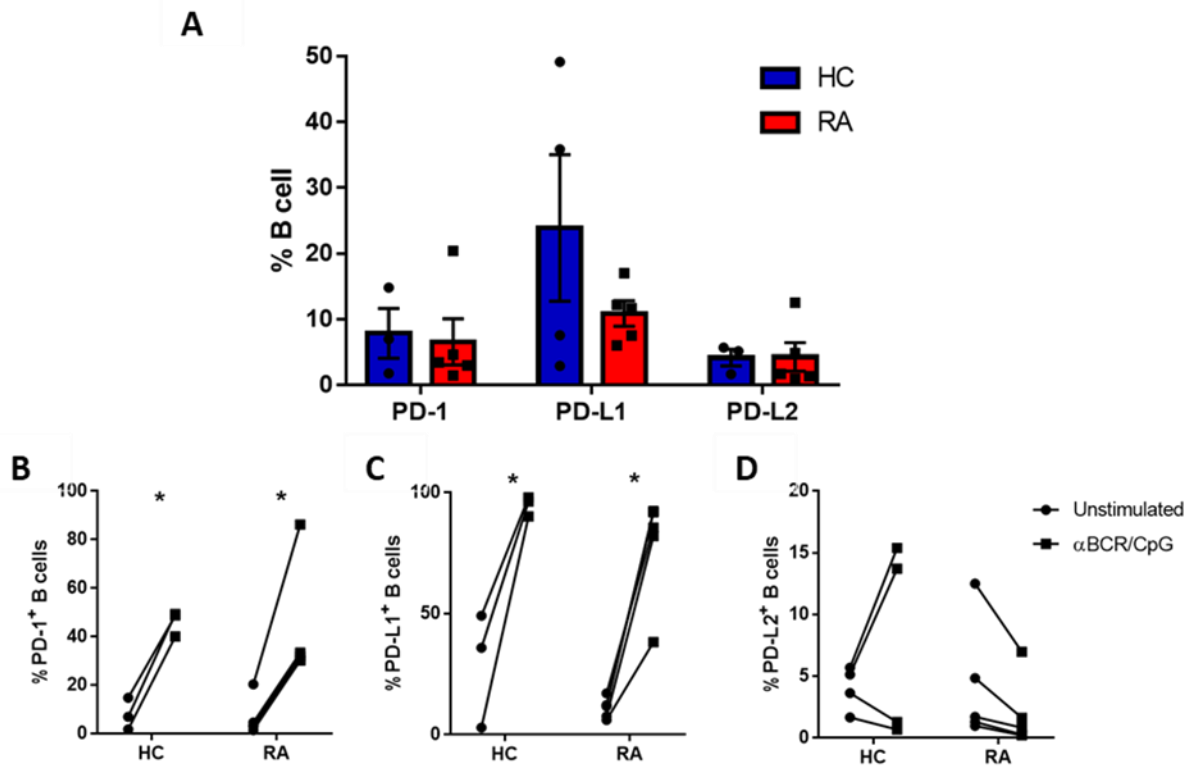


**Figura 20. Comparación de la capacidad de los iBregs de alterar el fenotipo de monocitos de pacientes con artritis reumatoide y controles sanos.** Monocitos de pacientes con AR y controles sanos, fueron co-cultivados con iBregs de manera autóloga durante 72hrs, posteriormente se evaluó la expresión de CD14, HLA-DR, CD86 y TIM-4 en los monocitos, mediante citometría de flujo. t test no pareado, n=5 para AR y n=6 para HC \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$





**Figura 21. Alteraciones en la frecuencia de linfocitos B TIM-1<sup>+</sup> y monocitos TIM-4<sup>+</sup> en pacientes con artritis reumatoide.** A) Frecuencia de linfocitos B TIM-1<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide (n=8) y controles sanos (n=5). B) Intensidad de fluorescencia media de la expresión de TIM-4 en monocitos de pacientes con AR (n=5) y HC (n=5). C) Frecuencia de linfocitos B TIM-1<sup>+</sup> de pacientes con AR (n=5), y controles sanos (n=3), posterior estímulo de inducción de iBregs. t test no pareado en A y B, t test pareado en C, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.



**Figura 22. Alteraciones en la frecuencia de linfocitos B PD-1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> y PD-L2<sup>+</sup> en pacientes con artritis reumatoide.** A) Frecuencia de linfocitos B positivos para la molecular indicada en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide (n=5) y controles sanos (n=4). B-D) Frecuencia de linfocitos B positivos para B) PD-1, C) PD-L1 y D) PD-L2 de pacientes con AR y controles sanos, posterior al estímulo de inducción de Bregs. t test no pareado en A, t test pareado en B-D, n= 3 o 4 en B-D \* p<0.05

En base a los resultados previamente mostrados, hemos sido capaces de reclutar, aunque limitado un grupo de pacientes con AR, caracterizar células B, monocitos, inducir iBregs y realizar co-cultivos de iBregs:monocitos, pudiendo observar alteraciones en células de pacientes con AR, con iBregs con capacidad reducida de inhibir a los monocitos y con menores niveles de expresión de las moléculas involucradas en este fenómeno. Lamentablemente por el contexto sanitario del país no fue posible reclutar más pacientes, por lo que no fuimos capaces de evaluar la capacidad de los iBregs sobre la respuesta de los monocitos frente a la estimulación con LPS, ni evaluar los niveles de citoquinas secretadas por los linfocitos B y los iBregs de pacientes para determinar el balance inflamatorio/antiinflamatorio presente en estos linfocitos en esta enfermedad.

## 9. Discusión

El campo de los linfocitos B reguladores puede ser considerado reciente, ya que este ha presentado mayor desarrollo en los últimos 15 años, la búsqueda de nuevos mecanismos regulatorios y sus blancos; la mejor forma de identificarlos y protocolos de diferenciación y expansión ofrecen un gran número de aristas para abordar su investigación. La relación de los linfocitos B reguladores con linfocitos T ha sido ampliamente abordado, pero poco se sabe de su interacción con otros tipos celulares como los monocitos, células relevantes en el desarrollo y perpetuación de enfermedades autoinmunes como la Artritis Reumatoide. Por otro lado, TIM-1 ha sido señalado como un potencial marcador de Bregs y como una molécula relevante en la función reguladora en modelos murino. A su vez y en base a nuevos antecedentes, PD-1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 aparecen como un nuevo mecanismo utilizado por los Bregs para modular el sistema inmune. En esta tesis se estudió el efecto de linfocitos B reguladores sobre monocitos, enfocándonos a dilucidar si los ejes TIM-1 y PD-1 estarían involucrados como mecanismos responsables de esta regulación y si estos se encuentran alterados en células de pacientes con AR. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, y gracias a una colaboración con el Banco de Sangre del HCUCH establecimos los protocolos necesarios para abordar este proyecto, y aproximarnos a entender como los linfocitos B reguladores pueden llegar a modular la acción de monocitos en contextos de salud y en autoinmunidad.

Los factores solubles con propiedades antiinflamatorias secretados por los Bregs han sido ampliamente descritos, siendo la IL-10 uno de los principales factores que contribuyen a la regulación (74,75). En relación con el objetivo específico 1, buscaba

evaluar el efecto de las células Bregs sobre los monocitos, logrando establecer que los linfocitos B reguladores inducen la inhibición en la expresión de la molécula de presentación antigénica HLA-DR en los monocitos, efecto que es mediado principalmente a través del contacto directo entre estas células, debido a que al realizar co-cultivos entre ambos tipos celulares utilizando cámaras Transwell, el efecto inhibitorio disminuyó drásticamente, con ello pudimos establecer que existe un efecto regulador ejercido por los iBregs sobre monocitos y que este es mediado principalmente por contacto célula a célula. Sin embargo, la estrategia utilizada en este trabajo no permite descartar la contribución de factores solubles en su efecto inhibitorio. De esta forma, este resultado nos entrega antecedentes que existen mecanismos reguladores contacto-dependientes por los cuales las Bregs ejercen su función, tales como; como TIM-1 o PD-1, que pudiesen estar involucrados. Por otro parte, como se discutió anteriormente, existen varias sub poblaciones de células B con propiedades reguladoras, nosotros hemos demostrado que la combinación de estímulos del TLR9 y BCR, inducen linfocitos B con propiedades reguladoras (69) caracterizadas por una alta expresión de TIM-1 y secreción de IL-10, en este trabajo complementamos su caracterización observando que estas presentan una alta expresión de PD-1 y PD-L1, que indicarían la presencia de linfocitos con un gran potencial regulador mediante este eje de acuerdo con los antecedentes ya reportados (55,89,90), dicho eje podría ejercer una función en conjunto con la secreción de citoquinas antiinflamatorias en la regulación de células del sistema inmune. Originalmente se planteó en esclarecer el rol funcional de TIM-1, proponiendo realizar separación celular mediante *cell sorting* sobre los linfocitos B e iBregs TIM-1<sup>+</sup>, puesto

que al utilizar el estímulo de inducción de iBregs, no todas la iBregs expresan TIM-1 en superficie, así una vez aisladas, realizar los co-cultivos de células B TIM-1<sup>+</sup> con los monocitos, sin embargo no pudimos realizar esta estrategia experimental debido a la escases de muestras, por lo que los efectos observados se deben a un población enriquecida en Bregs TIM-1<sup>+</sup>. En este misma línea, nosotros hemos aportado evidencia de la capacidad inhibitoria de los linfocitos B TIM-1<sup>+</sup> humanos en comparación a los linfocitos B TIM-1<sup>-</sup> sobre las células T (69), aunque no teníamos antecedentes de su efecto sobre otros tipos celulares. Un trabajo muy reciente, y de gran utilidad para esta línea de investigación, fue publicado el pasado mes, en donde presentan el primer protocolo de expansión ex-vivo de linfocitos B TIM-1<sup>+</sup> mediante el uso de un *cocktail* de citoquinas y CD40L(91). Esta nueva herramienta nos permitiría trabajar con cultivos altamente enriquecidos en este tipo celular y estudiar mejor forma el rol de TIM-1 en las interacciones célula a célula. Por otro lado, observamos que el efecto de los iBregs sobre la expresión de CD14, CD86 y TIM-4 en los monocitos no produjo una inhibición significativamente mayor que los linfocitos B, tampoco se observaron cambios considerables al evitar el contacto entre ambos tipos celulares utilizando placas Tw, por lo que este efecto inhibitorio en todas las condiciones evaluadas pudiera deberse principalmente a que estas moléculas son reguladas por mecanismos diferentes a los estudiados, necesitando otras señales para modular su expresión y poder observar diferencias entre condiciones, tales como; IL-4 para CD14 o CTLA-4 para CD86 (92–94).

Para determinar la función de los monocitos frente a estímulos externos, se activó el receptor TLR-4 mediante la adición de LPS. La capacidad de los monocitos para

responder frente a TLR4 fue evaluada por 2 técnicas dependiendo el tipo de co-cultivo realizado, por una parte, en los co-cultivos en Transwell en donde los monocitos fueron recuperados y posteriormente activados, las citoquinas secretadas fueron evaluadas mediante ELISA, y en los co-cultivos en donde se permitió en contacto directo entre ambos tipos celulares, se evaluó la expresión de citoquinas en los monocitos mediante citometría de flujo, debido a la imposibilidad de separar completamente ambos tipos celulares, ya que también los linfocitos B responden a la estimulación con LPS, así era imposible discriminar la contribución de estos.

El resultado obtenido en los cultivos Transwell nos permite afirmar que los iBregs modulan la respuesta de los monocitos mediante su interacción directa y de forma contacto-independiente, mediada por factores solubles (Figura 10), lo cual se asemeja a los obtenidos por el grupo de Tedder utilizando Bregs (B10) CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>, las que son capaces de inhibir la expresión de TNF- $\alpha$  en monocitos estimulados por 4h con LPS mediante, mediado principalmente por la IL-10 (45). Además, existe evidencia que la IL-10 es capaz de inhibir la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8; TNF- $\alpha$  y GM-CSF en monocitos humanos(95), por lo que la IL-10 producida por los iBregs explicaría en gran medida la respuesta que observamos en los monocitos provenientes de cultivos Transwell. Con esto podemos establecer que el efecto inhibitorio de iBregs sobre la función de los monocitos comprenden ambos mecanismos, ya que el contacto entre ambas células es esencial para inhibir la molécula de presentación antigénica HLA-DR, pero los factores secretados son suficientes para modular la respuesta de los monocitos frente a estímulos externos. Al analizar los resultados obtenidos de los co-cultivos en donde se permite el contacto entre ambos tipos celulares y que fue

determinado por citometría intracelular, observamos el mismo fenómeno que ocurre al utilizar las placas de Tw, en donde los iBregs fueron capaces de modular la respuesta de los monocitos frente a LPS, este resultado era esperable dado que la interacción que se lleva a cabo existe presencia de los factores solubles secretados por los Bregs. El bloqueo de los receptores de IL-10 y TGF- $\beta$  o la neutralización de estas citoquinas podría ayudar a complementar el análisis en estudios futuros, y así empezar a descomponer los mecanismos involucrados en el fenómeno inhibitorio observado. Como fueron usadas 2 técnicas distintas, no fue posible comparar la respuesta de los monocitos entre ambos tipos de co-cultivos, pero sería interesante a futuro realizarlo con un mayor acceso a donantes. Con estos resultados se reafirma la propuesta de que la inhibición mediada por los linfocitos B reguladores involucra tanto la interacción física célula a célula como la presencia de moléculas secretadas por los linfocitos y que probablemente actúen en sinergia.

El objetivo específico 2 proponía determinar el rol de TIM-1 y PD-1 con sus ligandos, TIM-4 y PD-L1/ PD-L2, respectivamente en el efecto inhibitorio de los linfocitos B sobre los monocitos. Para abordar la primera arista inicialmente se realizaron experimentos para bloquear la interacción de TIM-1 con sus ligandos mediante el uso de anticuerpos antagonistas de la molécula TIM-1, lamentablemente los anticuerpos comerciales disponibles poseen la desventaja que no están diseñados para cultivo celular por lo que contienen azida y endotoxinas, ya que al realizar los co-cultivos y utilizar este anticuerpo y su isotipo en distintas concentraciones se observó una ablación o una severa disminución de la población CD14+ en la citometría de flujo. Otra alternativa para bloquear TIM-1 utilizada en la literatura es el uso de Fosfatidilserina, ligando



natural de TIM-1 (67), sin embargo, esta estrategia no puede asegurar si efectivamente se bloquearía la interacción de TIM-1 con TIM-4 o la favorecería, dado que podría involucra otro sitio de unión o, la fosfatidilserina podría hacer de vínculo entre ellas ya que ambas reconocen este fosfolípido(66,67), por lo cual fue descartada. Cabe señalar que, tanto linfocitos B como monocitos presentan receptores para regiones Fc de anticuerpos, por lo que el uso de estos podría también desencadenar la activación de señales en ambos tipos celulares y generar efectos que no necesariamente puedan ser debidos al bloqueo de dicha interacción. Debido a esto se optó por el silenciamiento génico de TIM-1 mediante siRNA, comprobando inicialmente los niveles de transcrito de TIM-1 en las células B mediante qPCR y los distintos protocolos disponibles, escogimos el silenciamiento mediante la magnetofección, el cual anticipaba mantener una alta viabilidad celular sin inducir la maduración de los linfocitos B. Para estandarizar las condiciones de transfección, inicialmente utilizamos la línea celular Huh 7.5 que expresa en forma constitutiva TIM-1 (85), favorablemente fuimos capaces de establecer un protocolo de magnetotransfección de siRNA en esta línea celular, y comprobamos mediante Western Blot la efectividad de nuestra estrategia seleccionada al obtener la disminución significativa de la expresión de GAPD y de TIM-1. La gran dificultad fue intentar silenciar genes en los linfocitos B, su tamaño más pequeño, el número de células necesarias y al no ser adherentes dificultaron el procedimiento. Como se mencionó en los resultados, solamente fuimos capaces de silenciar GAPD en los linfocitos B sin estimular. Dentro de las causas por las que no logramos silenciar TIM-1 creemos que, por un lado los estímulos utilizados podrían estar uniéndose a las nanopartículas utilizadas en esta técnica interfiriendo con la

entrega del siRNA a la maquinaria celular involucrada con el silenciamiento, por otro lado, estos estímulos activan a los linfocitos y además promueven su proliferación, esto implica un gran aumento del material genético dentro de la célula y la dilución de nuestros complejos siRNA-nanopartícula tras consecutivas rondas de proliferación. Como demostramos por citometría de flujo, qPCR y WB, TIM-1 es inducible y en linfocitos B sin estimular representa un porcentaje muy bajo por lo que necesariamente debíamos activar nuestros linfocitos para poder validar la estrategia. Sin embargo, con esta estrategia solo fuimos capaces de silenciar GAPD en los linfocitos B sin estimular, algo que no estaba descrito a la fecha utilizando esta técnica. El silenciamiento génico de cultivos primarios siempre ha resultado complejo, principalmente porque las técnicas más comúnmente utilizadas para transfectar afectan la viabilidad y activan a las células, el uso de CRISPR actualmente presenta una gran alternativa de silenciamiento efectiva para cultivos primarios debido a su gran eficiencia (96), existiendo en la literatura protocolos establecidos con los parámetros óptimos para lograr la edición del material genético en linfocitos B (97,98), con esta información y con el acceso al equipamiento podríamos plantear nuevos objetivos a futuro y así poder eliminar TIM-1 de manera efectiva en nuestros iBregs para poder estudiar su relevancia en las interacciones célula a célula(91).

De manera alternativa, favorablemente pudimos abordar parte del objetivo utilizando la línea celular Huh 7.5, ya que mediante co-cultivos con monocitos que expresan el ligando de TIM-1, nos permitía hacer comparaciones utilizando las células Huh 7.5 que expresan TIM-1 y su contraparte, Huh 7.5 silenciado TIM-1. Es de esta forma que comprobamos que TIM-1 cumple un rol regulador en la respuesta de los monocitos,

observamos que su ausencia favorece respuestas inflamatorias, por lo que se puede especular que lo observado en los modelos murinos, posiblemente ocurre en los linfocitos B reguladores humanos, en donde la interacción de TIM-1 con sus ligandos podría estar generando una mayor inducción de citoquinas antiinflamatorias en los linfocitos B y/o actuar directamente sobre la célula blanco si esta expresa su ligando TIM-4. Actualmente se sabe que TIM-4 no posee un sitio intracelular activo por el cual gatillar una respuesta dentro de la célula, pero se especula que el reclutamiento de varias de estas moléculas frente a su ligando podría desencadenar respuestas internas debido que este reclutamiento en la superficie celular permitiría activar otras moléculas no esclarecidas de forma *cis* (99). Para clarificar completamente los mecanismos involucrados en la función de los linfocitos B reguladores a través de su interacción de TIM-1 con su ligando, es importante también estudiar la vía de señalización que se activaría cuando TIM-1 se une a su ligando y que efectos tendría sobre la función reguladora, ya que se ha establecido una correlación entre la activación de STAT3 río abajo y la expresión de IL-10 (69,91), por lo que el reconocimiento de sus ligandos podría desencadenar una mayor secreción de IL-10 por parte de los linfocitos B, potenciando su función reguladora (100). Para conocer más profundamente los mecanismos reguladores de los linfocitos B TIM-1<sup>+</sup>, es necesario explorar los mecanismos de transducción de señales que involucra este eje, así obtener una imagen más clara de cómo se generan los fenómenos observados en este trabajo y conocer si los mecanismos regulatorios son dependientes de TIM-1 como ocurre en modelos murinos, para ello es necesario la disponibilidad de anticuerpos agonistas y antagonistas para TIM-1, así como también, trabajar con una población pura de

linfocitos B TIM-1 aislados, algo que actualmente podría ser más factible debido al protocolo de expansión antes mencionado.

La otra arista de este objetivo correspondía al eje PD-1 y sus ligandos, como observamos en la figura 3, las moléculas PD-1 y PD-L1 aumentaron su expresión frente a nuestro estímulo inductor, mas no PD-L2, por lo que utilizamos anticuerpos bloqueantes de PD-1 y PD-L1 en los linfocitos B para ser utilizados posteriormente en los co-cultivos, gracias a esto pudimos demostrar que al bloquear PD-L1 en los iBregs disminuye su capacidad reguladora, ya que los monocitos expresaron HLA-DR casi a los mismo niveles que cuando se encuentran en cultivos sin contacto con los iBregs. Este resultado se condice con lo encontrado en la literatura, en donde el bloqueo de PD-L1 en linfocitos B PD-L1<sup>hi</sup> afecta su capacidad reguladora disminuyendo su capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T CD4 y CD8. Aún falta por develar si este bloqueo de PD-L1 conlleva también a una disminución en la secreción de IL-10, ya que existe evidencia que relacionan ambos mecanismos(53). La frecuencia de monocitos que expresan PD-1 es muy baja y se atribuye a condiciones y situaciones especiales en el individuo como infección o estrés celular(101,102). Es importante entonces explorar los efectos *cis* de PD-L1, ya que se existe evidencia que este interactúa con CD80 alterando el normal funcionamiento del eje PD-1/PD-L1 entre APCs y linfocitos T(103), pero nada se conoce de los alcances en linfocitos B reguladores. En este trabajo, demostramos que PD-L1 cumple un papel crucial en los linfocitos B reguladores, probablemente en conjunto a TIM-1 y citoquinas antiinflamatorias que regulan la función de los monocitos y explicarían los fenómenos observados en los resultados asociados al primer objetivo. Cabe señalar que descifrar

y comprender a cabalidad los diversos mecanismos involucrados en la función reguladora de los linfocitos B conlleva una búsqueda constante mediante diversas estrategias, existen otros posibles mecanismos que en conjunto a los aportados por este trabajo, pueden ser complementados para dilucidar aquellos involucrados en la modulación de respuestas inflamatorias abarcando la distintos tipos celulares involucrados (104).

En el objetivo específico 3 de este trabajo, buscamos dilucidar alteraciones en la comunicación del eje TIM-1/ Ligandos de TIM-1 y PD-1/Ligando de PD-1 entre linfocitos B reguladores y monocitos de pacientes con AR. Esta arista no fuimos capaz de abordarla completamente por la imposibilidad de poder seguir accediendo al reclutamiento de pacientes por motivo de la crisis sanitaria. Si embargo, como observamos en la figura 19 los linfocitos B de pacientes con AR inducen la expresión de HLA-DR y de CD86 en los monocitos, esto indicaría que los linfocitos B presentarían un perfil inflamatorio basal capaz de activar monocitos autólogos. Por consiguiente, es esperable una elevada secreción basal de citoquinas como IL-6 y TNF- $\alpha$  en los linfocitos B de pacientes que podría estar explicando el fenómeno observado(105,106). En cuanto a la funcionalidad de los iBregs de pacientes con AR, se observó una disminución en su capacidad inhibitoria en comparación a controles sanos (Figura 20). Estos resultados nos permiten establecer que existen un mecanismo alterado en AR que afecta la capacidad reguladora de los iBregs, pudiendo existir deficiencias tanto en los linfocitos B como en los monocitos que pudiesen explicar este fenómeno, tales como; una menor secreción de IL-10, un balance de citoquinas hacia un perfil proinflamatorio o, una menor expresión de receptores para citoquinas inhibitorias en

los monocitos. Para descifrar esta incógnita, se necesitarían realizar co-cultivos alogénicos con células provenientes de pacientes con AR y controles sanos.

Al evaluar en detalle el eje TIM-1/TIM-4 entre las células involucradas, destacamos una baja frecuencia de linfocitos B TIM-1<sup>+</sup>, alteraciones en la capacidad de inducción de iBregs TIM-1<sup>+</sup> y una menor expresión de TIM-4 en monocitos de pacientes con AR en relación a controles sanos, lo que sugiere que la comunicación del eje TIM-1/TIM-4 estaría alterada, esto nos permitiría explicar, en parte, los efectos observados en las figuras 19 y 20, probablemente debido a una población disminuida de linfocitos B con capacidad reguladora en sangre periférica de los pacientes con AR.

Al evaluar la participación del eje PD-1 y sus ligandos en la comunicación entre las iBregs y monocitos, no observamos alteraciones, pero atribuimos esto al reducido tamaño muestral con el cual se llevaron a cabo estos análisis, es posible observar una tendencia en la figura 22A, que muestra una disminuida frecuencia de linfocitos B que expresan de PD-L1 en los pacientes con AR, algo que se condice con lo reportado en la literatura para esta enfermedad (62) y explicaría de paso, parte del fenómeno observado, ya que observamos que PD-L1 favorece la inhibición de la activación de monocitos, y al estar disminuida esta población, se favorecería un respuesta inmune con características inflamatorias.

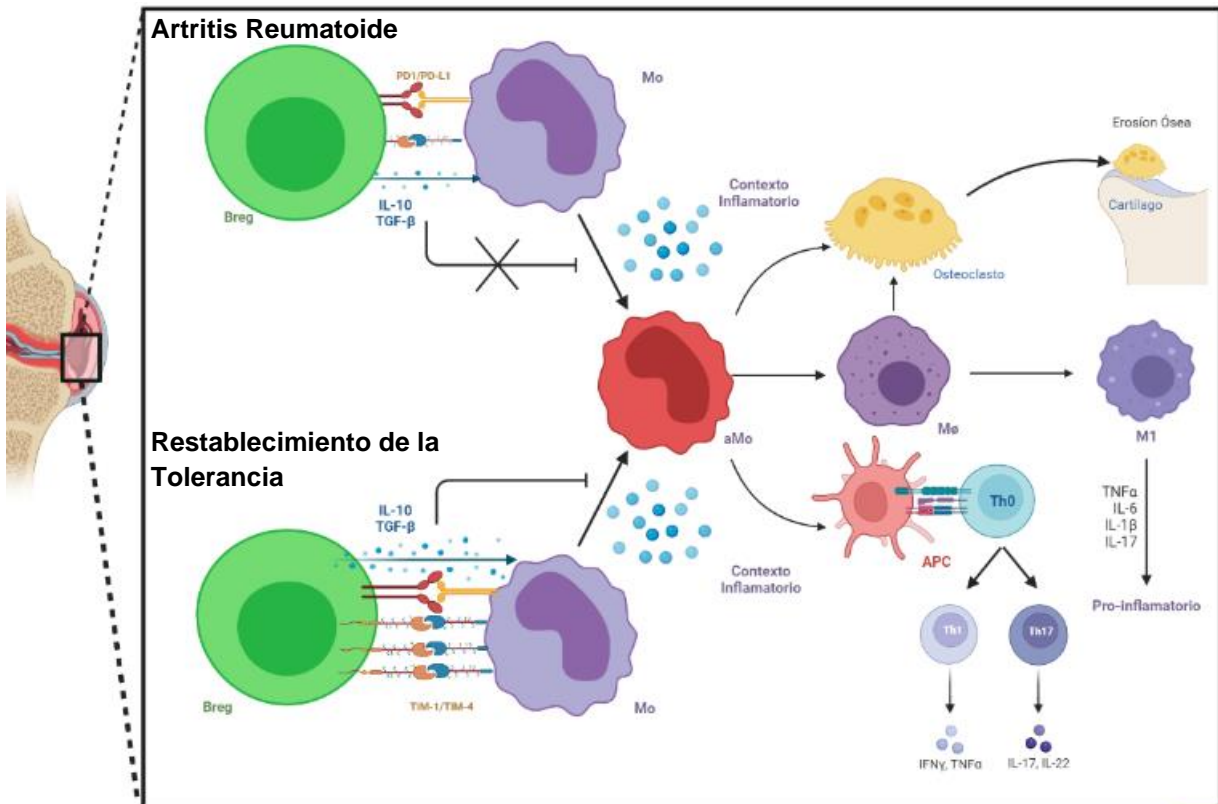
Al integrar los resultados obtenidos en este trabajo, podemos establecer que los linfocitos B reguladores inducidos (iBregs) inhiben la expresión de HLA-DR en monocitos de forma contacto dependiente, mientras que los factores solubles son suficientes para inhibir la función de los monocitos. Mediante la estrategia utilizada,

creemos que la interacción de TIM-1 con sus ligandos es necesaria para ejercer un rol regulador sobre los monocitos. Además, determinamos mediante ensayos de bloqueo de PD-L1 en los iBregs, esta molécula cumple una función reguladora relevante. Al reunir estos resultados podemos establecer que los Bregs modulan la función de monocitos mediante el eje PD-1/ PD-L1 junto a la secreción de citoquinas antiinflamatorias y posiblemente la interacción de TIM-1 con TIM-4. En relación a los pacientes con AR, observamos que los iBregs de pacientes con AR presentan una capacidad reducida de inhibir la expresión de HLA-DR en monocitos autólogos. Además, se observó una menor frecuencia de células B TIM-1<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con AR, una reducida capacidad de las células B de pacientes con AR de inducir Bregs, y una menor expresión de TIM-4 en monocitos en comparación a controles sanos. No se observaron alteraciones en la expresión de PD-L1 en los iBregs de los pacientes con AR. Con estos resultados y en conjunto con los antecedentes podemos proponer que los linfocitos B con capacidad reguladora que se encontrarían en los linfonodos e infiltrados en las cercanías de las articulaciones afectadas de los pacientes con AR, presentarían deficiencias en su capacidad de regular a los monocitos reclutados a las articulaciones, presentando una menor secreción de IL-10 y una alterada comunicación mediante el eje TIM-1/TIM-4, debido a una menor frecuencia de linfocitos B TIM-1<sup>+</sup> circulantes y a la imposibilidad de los linfocitos B de inducir TIM-1, debido a esta deficiencia, los monocitos responderían al contexto inflamatorio de la enfermedad, activándose y diferenciándose, favoreciendo el círculo inflamatorio y de daño en la articulación; en la siguiente sección se presenta un modelo puesto que ilustraría lo señalado (Figura 23). Con estos resultados esperamos haber

contribuido a entender como los linfocitos B reguladores ejercen su función sobre los monocitos y como las alteraciones en su frecuencia, fenotipo y función podría estar favoreciendo y perpetuando el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la Artritis Reumatoide. Además, los resultados generados permitirán potenciar la investigación del posible uso de los linfocitos B reguladores como terapia celular autóloga, favoreciendo la restitución de la tolerancia ante enfermedades autoinmunes como la AR, ampliando el conocimiento sobre los mecanismo y alcances celulares que podrían tener estas células en el sistema inmune.



## 10. Modelo propuesto



**Figura 23 Modelo de los mecanismos de regulación ejercidos por los Bregs sobre los monocitos en Artritis Reumatoide y en el restablecimiento de la tolerancia.**

En AR los monocitos quimioatraídos al sinovio se ven enfrentados a un contexto inflamatorio constante que induciría su activación y consecuentemente diferenciándose a Osteoclastos, Macrófagos M1 y a un perfil de APC, fenómeno que potencia el desarrollo y perpetuación de la enfermedad, esta respuesta por parte de los monocitos sería favorecida por una deficiente regulación mediada por los Bregs en

el sinovio y en los linfonodos locales. Esto podría ser debido a una menor secreción de citoquinas antiinflamatorias y una menor expresión de TIM-1 en los Bregs. En el restablecimiento de la tolerancia como posible terapia, los Bregs serían capaces modular las respuestas de los monocitos, impidiendo su diferenciación en un contexto inflamatorio.

## **11. Conclusiones**

1. Los linfocitos B reguladores son capaces de inhibir la función de monocitos mediante factores solubles e interacciones célula a célula.
2. La inhibición de los monocitos por los linfocitos B reguladores es mediada en forma parcial por la interacción PD-1/PD-L1.
3. La activación de los monocitos es inhibida parcialmente a través de la interacción de TIM-1 y sus ligandos.
4. Los linfocitos B reguladores de pacientes con Artritis Reumatoide presentan una menor capacidad inhibitoria sobre monocitos en comparación a los de controles sanos.
5. Los pacientes con Artritis Reumatoide presentan una menor frecuencia de linfocitos B TIM-1 y una menor expresión de TIM-4 en monocitos, en comparación a lo observado en controles sanos.

## 12. Bibliografía

1. Breedveld FC. New insights in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* (1998) 53:3–7.
2. Riedemann P., Radrigan F., Estrada V. VA. Guía Clínica Artritis Reumatoidea. *Minsal Santiago-Chile* (2007)
3. Kapitány A, Zilahi E, Szántó S, Szücs G, Szabó Z, Végvári A, Rass P, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z. Association of Rheumatoid Arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann N Y Acad Sci* (2005) 1051:263–270.
4. Van Der Helm-Van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TWJ, Toes REM, De Vries RRP. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2006) 54:1117–1121.
5. Gerlag DM, Raza K, Van Baarsen LGM, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, Gabay C, Catrina AI, Cope AP, Cornelis F, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* (2012) 71:638.
6. Symmons DPM, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DGI, Silman AJ. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* (1997) 40:1955–1961.
7. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, Gmnewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* (2008) 67:1488–1492.
8. Nielsen SF, Bojesen SE, Schnohr P, Nordestgaard BG. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study. *BMJ* (2012) 345:
9. Nguyen H, James EA. Immune recognition of citrullinated epitopes. *Immunology*

- (2016) 149:131–138.
10. Van De Sande MGH, De Hair MJH, Van Der Leij C, Klarenbeek PL, Bos WH, Smith MD, Maas M, De Vries N, Van Schaardenburg D, Dijkmans BAC, et al. Different stages of rheumatoid arthritis: features of the synovium in the preclinical phase. *Ann Rheum Dis* (2011) 70:772–777.
  11. Tan EM, Smolen JS. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *J Exp Med* (2016) 213:1937–1950.
  12. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* (2011) 365:2205–2219.
  13. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2014) 10:593–601.
  14. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016 128 (2016) 12:472–485.
  15. Mellado M, Martínez-Muñoz L, Cascio G, Lucas P, Pablos JL, Rodríguez-Frade JM. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* (2015) 6:
  16. Nawata Y, Eugui EM, Lee SW, Allison AC. IL-6 is the principal factor produced by synovia of patients with rheumatoid arthritis that induces B-lymphocytes to secrete immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* (1989) 557:230–8, discussion 239.
  17. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* (2018) 36:175–184.
  18. Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest* (1996) 97:2027–2037.
  19. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2012) 51 Suppl 5:
  20. Lubberts E, Joosten LAB, van de Loo FAJ, Schwarzenberger P, Kolls J, van den Berg WB. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res*

- (2002) 51:102–104.
21. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* (2004) 200:277–285.
  22. Roosnek E, Lanzavecchia A. Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells. *J Exp Med* (1991) 173:487–489.
  23. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, Van Venrooij WJ, De Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes REM, Huizinga TWJ. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* (2004) 50:709–715.
  24. Hecht C, Schett G, Finzel S. The impact of rheumatoid factor and ACPA on bone erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2015) 74:e4.
  25. Harre U, Schett G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* (2017) 39:355–363.
  26. Seyler TM, Park YW, Takemura S, Bram RJ, Kurtin PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* (2005) 115:3083.
  27. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* (2007) 7:429–442.
  28. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *Biomed Res Int* (2014) 2014:
  29. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* (2013) 9:24–33.
  30. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14 bright CD16 2 Monocyte Subset Is Expanded in Rheumatoid Arthritis and Promotes Expansion of the Th17 Cell Population. (2012) 64:671–677.
  31. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation : circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory

- diseases. (2014)1–9.
32. Komano Y, Nanki T, Hayashida K, Taniguchi K, Miyasaka N. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. (2006) 8:1–14.
  33. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell-deficient Mice. *J Exp Med* (1996) 184:2271–2278.
  34. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates {IL-10-Producing} Regulatory B Cell Subset Characterized by {CD1d} Upregulation. (2002) 16:219–230.
  35. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. (2003) 197:489–501.
  36. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* (2002) 3:944–50.
  37. Sun C-M, Deriaud E, Leclerc C, Richard L-M. Upon {TLR9} Signaling, {CD5+} B Cells Control the {IL-12-Dependent} {Th1-Priming} Capacity of Neonatal {DCs}. (2005) 22:467–477.
  38. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of {CD4+CD25+} T regulatory cells and {IL-10} via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. (2007) 178:3447–3456.
  39. Carter NA, Rosser EC, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* (2012) 14:R32.
  40. Shimomura Y, Mizoguchi E, Sugimoto K, Kibe R, Benno Y, Mizoguchi A, Bhan AK. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. (2008) 20:729–737.
  41. Evans JG, A C-RK, Eddaoudi A, Almut M-B, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. (2007) 178:7868–7878.
  42. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. Selective Targeting of B Cells with Agonistic Anti-

- CD40 Is an Efficacious Strategy for the Generation of Induced Regulatory T2-Like B Cells and for the Suppression of Lupus in MRL/lpr Mice . *J Immunol* (2009) 182:3492–3502.
43. Chong AS, Sciammas R. Matchmaking the B-cell signature of tolerance to regulatory B cells. *Am J Transplant* (2011) 11:2555–2560.
  44. Noh J, Choi W, Noh G, Lee J. Presence of Foxp3-expressing {CD19(+)CD5(+)} B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human {CD19(+)CD5(+)} Foxp3(+) Regulatory B Cell {(Breg)}. *Immune Netw* (2010) 10:247–249.
  45. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, et al. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* (2011) 117:530–541.
  46. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JOO, Hillion S. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- $\beta$ /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun* (2015) 59:53–60.
  47. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TFEE, Beyer T, Reister F, Fabricius D, Lotfi R, et al. Interleukin 21-induced granzyme b-expressing b cells infiltrate tumors and regulate t cells. *Cancer Res* (2013) 73:2468–2479.
  48. Tretter T, Venigalla RKC, Eckstein V, Saffrich R, Sertel S, Ho AD, Tretter T, Venigalla RKC, Eckstein V, Saffrich R, et al. Induction of CD4 + T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells Induction of CD4  $\geq$  T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells. (2008) 112:4555–4564.
  49. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* (2007) 8:1353–1362.
  50. Totsuka T, Kanai T, Makita S, Fujii R, Nemoto Y, Oshima S, Okamoto R, Koyanagi A, Akiba H, Okumura K, et al. Regulation of murine chronic colitis by CD4+CD25- programmed death-1+ T cells. *Eur J Immunol* (2005) 35:1773–



1785.

51. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* (2009) 206:3015–3029.
52. Gotot J, Gottschalk C, Leopold S, Knolle PA, Yagita H, Kurts C, Ludwig-Portugall I. Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci* (2012) 109:10468–10473.
53. Siewe B, Wallace J, Rygielski S, Stapleton JT, Martin J, Deeks SG, Landay A. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One* (2014) 9:e92934.
54. Xiao X, Lao XM, Chen MM, Liu RX, Wei Y, Ouyang FZ, Chen DP, Zhao XY, Zhao Q, Li XF, et al. PD-1hi identifies a novel regulatory b-cell population in human hepatoma that promotes disease progression. *Cancer Discov* (2016) 6:546–559.
55. Wang X, Wang G, Wang Z, Liu B, Han N, Li J, Lu C, Liu X, Zhang Q, Yang Q, et al. PD-1-expressing B cells suppress CD4+ and CD8+ T cells via PD-1/PD-L1-dependent pathway. *Mol Immunol* (2019) 109:20–26.
56. Zhao Y, Shen M, Feng Y, He R, Xu X, Xie Y, Shi X, Zhou M, Pan S, Wang M, et al. Regulatory B cells induced by pancreatic cancer cell-derived interleukin-18 promote immune tolerance via the {PD-1/PD-L1} pathway. *Oncotarget* (2017) 5:14803–14814.
57. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun* (2015) 6:5997.
58. Said SS, Barut GT, Mansur N, Korkmaz A, Sayi-Yazgan A. Bacterially activated B-cells drive T cell differentiation towards Tr1 through PD-1/PD-L1 expression. *Mol Immunol* (2018) 96:48–60.
59. Mielle J, Audo R, Hahne M, Macia L, Combe B, Morel J, Daien C. IL-10 Producing B Cells Ability to Induce Regulatory T Cells Is Maintained in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* (2018) 9:961.
60. Kim Y, Kim G, Shin H-J, Hyun J-W, Kim S-H, Lee E, Kim HJ. Restoration of

regulatory B cell deficiency following alemtuzumab therapy in patients with relapsing multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* (2018) 15:300.

61. Stefanski AL, Wiedemann A, Reiter K, Hiepe F, Lino AC, Dörner T. Enhanced Programmed Death 1 and Diminished Programmed Death Ligand 1 Up-Regulation Capacity of Post-Activated Lupus B Cells. *Arthritis Rheumatol* (2019) 71:1539–1544.
62. Zacca ER, Onofrio LI, Acosta CDV V., Ferrero P V., Alonso SM, Ramello MC, Mussano E, Onetti L, Cadile II, Stancich MI, et al. PD-L1+ Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment. *Front Immunol* (2018) 9:2241.
63. Meyers J, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK. The {TIM} gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* (2005) 11:362–369.
64. Rennert PD. Novel roles for {TIM-1} in immunity and infection. *Immunol Lett* (2011) 141:28–35.
65. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* (2010) 235:172–89.
66. Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* (2005) 6:455–464.
67. Kobayashi N, Karisola P, Peña-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, Butte MJ, Nagumo H, Chernova I, Zhu B, et al. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* (2007) 27:927–40.
68. Shi B, Xiao L, Gao Y, He X, Xu X, Huang H, Zhou W, Han Y. Identification and functional study of Tim-1(+)/CD19(+) regulatory B cell in kidney transplantation recipients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (2011) 91:3388–92.
69. Aravena O, Ferrier A, Menon M, Mauri C, Aguillón JC, Soto L, Catalán D. TIM-1

- defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* (2017) 19:8.
70. Zhu G, Liu Y, Zhang W, Huang Y, Li K. {CD27+TIM-1+} memory B cells promoted the development of Foxp3+ Tregs and were associated with better survival in acute respiratory distress syndrome. *Immunol Res* (2018) 66:281–287.
  71. Ding Q, Yeung M, Camirand G, Zeng Q, Akiba H, Yagita H, Chalasani G, Sayegh MH, Najafian N, Rothstein DM. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest* (2011) 121:3645–3656.
  72. Xiao S, Brooks CR, Sobel RA, Kuchroo VK. Tim-1 Is Essential for Induction and Maintenance of IL-10 in Regulatory B Cells and Their Regulation of Tissue Inflammation. *J Immunol* (2015) 194:1602–1608.
  73. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or A. Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *J Immunol* (2007) 178:6092–6099.
  74. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* (2010) 32:129–140.
  75. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, Musette P. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol* (2010) 40:2686–2691.
  76. Zheng J, Liu Y, Lau Y-L, Tu W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* (2010) 7:44–50.
  77. Lin W, Jin L, Chen H, Wu Q, Fei Y, Zheng W, Wang Q, Li P, Li Y, Zhang W, et al. B cell subsets and dysfunction of regulatory B cells in IgG4-related diseases and primary Sjögren's syndrome: the similarities and differences. *Arthritis Res Ther* (2014) 16:R118.
  78. Soto L, Ferrier A, Aravena O, Fonseca E, Berendsen J, Biere A, Bueno D, Ramos

- V, Aguillón JC, Catalán D. Systemic Sclerosis Patients Present Alterations in the Expression of Molecules Involved in B-Cell Regulation. *Front Immunol* (2015) 6:496.
79. Engelmann R, Wang N, Kneitz C, Müller-Hilke B. Bone resorption correlates with the frequency of CD5+ B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)* (2015) 54:545–553.
80. Cui D, Zhang L, Chen J, Zhu M, Hou L, Chen B, Shen B. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. *Clin Exp Med* (2015) 15:285–292.
81. Ma L, Liu B, Jiang Z, Jiang Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* (2014) 33:187–195.
82. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* (2013) 5:173ra23.
83. Maddur M. Regulation of human dendritic cells by B cells depends on the signals they receive. (2012) 119:3863–3865.
84. Morva A, Lemoine S, Achour A, Pers J-OO, Youinou P, Jamin C. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood* (2012) 119:106–114.
85. Chu LW, Yang CJ, Peng KJ, Chen PL, Wang SJ, Ping YH. TIM-1 as a signal receptor triggers dengue virus-induced autophagy. *Int J Mol Sci* (2019) 20:
86. Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanopatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine* (2012) 7:3445–3471.
87. Valdiglesias V, Ozde Kilip G, Costa C, Fern Andez-Bert Olez N, Asaro EP, Ao J, Teixeira P, Laffon B. Effects of Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Genotoxicity, Developmental Toxicity, and Neurotoxicity.
88. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, Noto A, Ancuta P, Peretz Y, et al. Programmed death-1–induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat*

*Med* 2010 164 (2010) 16:452–459.

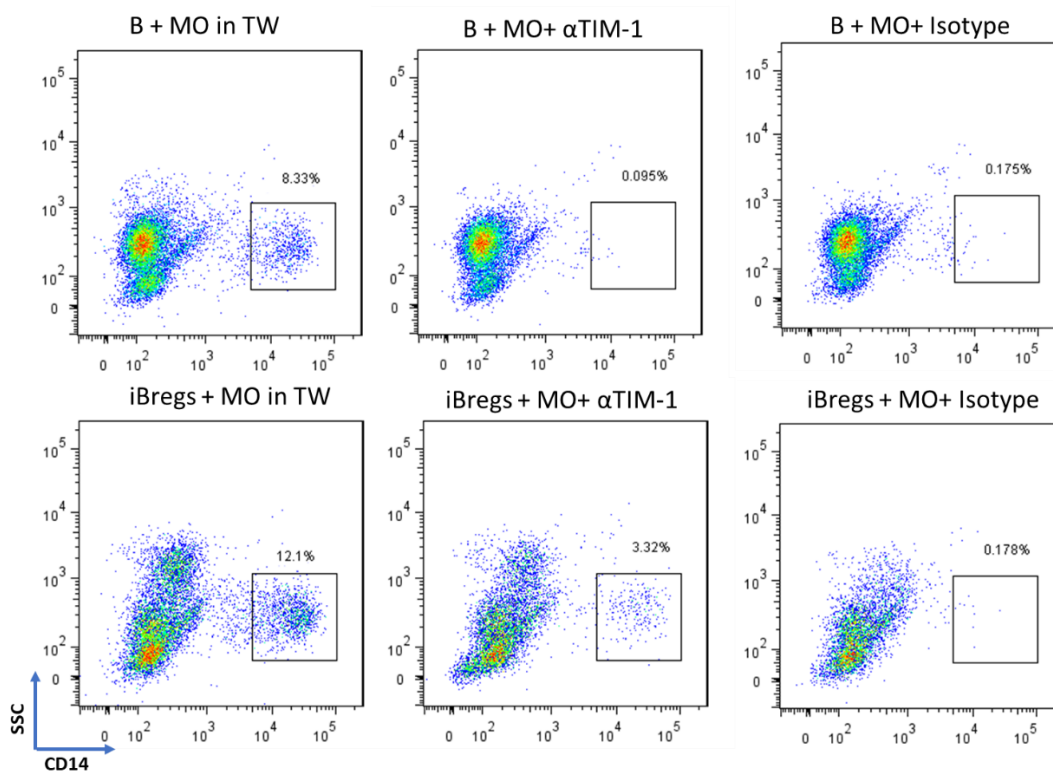
89. Xiao X, Lao XM, Chen MM, Liu RX, Wei Y, Ouyang FZ, Chen DP, Zhao XY, Zhao Q, Li XF, et al. PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. *Cancer Discov* (2016) 6:546–559.
90. Zhao Y, Shen M, Feng Y, He R, Xu X, Xie Y, Shi X, Zhou M, Pan S, Wang M, et al. Regulatory B cells induced by pancreatic cancer cell-derived interleukin-18 promote immune tolerance via the PD-1/PD-L1 pathway. *Oncotarget* (2018) 9:14803–14814.
91. Shankar S, Stolp J, Juvet SC, Beckett J, Macklin PS, Issa F, Hester J, Wood KJ. Ex vivo-expanded human CD19+TIM-1+ regulatory B cells suppress immune responses in vivo and are dependent upon the TIM-1/STAT3 axis. *Nat Commun* (2022) 13:
92. Ruppert J, Friedrichs D, Xu H, Peters JH. IL-4 Decreases the Expression of the Monocyte Differentiation Marker CD14, Paralleled by an Increasing Accessory Potency. *Immunobiology* (1991) 182:449–464.
93. Ovcinnikovs V, Ross EM, Petersone L, Edner NM, Heuts F, Ntavli E, Kogimtzis A, Kennedy A, Wang CJ, Bennett CL, et al. CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Sci Immunol* (2019) 4:
94. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* (2006) 118:240–249.
95. Abrams J, Figdor CG, De Waal Malefyt R, Bennett B, De Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* (1991) 174:1209–1220.
96. Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, Steinfeld I, Lunstad BD, Kaiser RJ, Wilkens AB, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol* 2015 339

- (2015) 33:985–989.
97. Hung KL, Meitlis I, Hale M, Chen CY, Singh S, Jackson SW, Miao CH, Khan IF, Rawlings DJ, James RG. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Mol Ther* (2018) 26:456–467.
  98. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Sci Rep* (2018) 8:1–9.
  99. Park D, Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Curr Biol* (2009) 19:346–351.
  100. Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, et al. IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* (2013) 122:3940–3950.
  101. Zasada M, Lenart M, Rutkowska-Zapała M, Stec M, Durlak W, Grudzień A, Krzeczowska A, Mól N, Pilch M, Siedlar M, et al. Analysis of PD-1 expression in the monocyte subsets from non-septic and septic preterm neonates. *PLoS One* (2017) 12:
  102. Jackson CM, Choi J, Routkevitch D, Pant A, Saleh L, Ye X, Caplan JM, Huang J, McDougall CG, Pardoll DM, et al. PD-1+ Monocytes Mediate Cerebral Vasospasm Following Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery* (2021) 88:855–863.
  103. Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Takemoto T, Okazaki T. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science* (2019) 364:558–566.
  104. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, Aravena O. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol* (2021) 12:654.
  105. Wu F, Gao J, Kang J, Wang X, Niu Q, Liu J, Zhang L. B Cells in Rheumatoid Arthritis : Pathogenic Mechanisms and Treatment Prospects. *Front Immunol*

(2021) 12:3987.

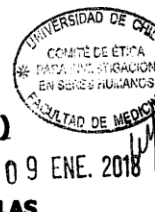
106. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimi M, Maid R, Feldmann M, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* (1988) 18:1797–1802.

### 13. Anexos



**Figura 24. Efecto del anticuerpo antagonista de TIM-1 en co-cultivos.** Dotplots representativos de la frecuencia de monocitos (MO) determinado por la expresión de CD14 después de 72 horas en co-cultivo con linfocitos B o iBregs autólogos, en presencia de anticuerpo antagonista  $\alpha$ TIM-1 (centro), isotipo (derecha) y PBS (izquierda). Figura representativa de 3 experimentos independientes. Tw: Transwell, MO: monocitos.





## **CONSENTIMIENTO INFORMADO (PACIENTE CON ARTRITIS REUMATOIDE)**

### **Participación en estudio "LAS CÉLULAS B REGULADORAS MEDIAN LA FUNCIÓN REGULADORA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS A TRAVÉS DE TIM-1, UN POSIBLE MECANISMO ALTERADO EN AUTOINMUNIDAD"**

#### **Grupo: Paciente con artritis reumatoide (AR)**

**Nombre del Investigador Principal:** DR. OCTAVIO ARAVENA MADARIAGA

**R.U.T.:** 12.315.484-3

**Investigadora Colaboradora HCUCH:** DRA. LILIAN SOTO SÁEZ

**R.U.T.:** 10.331.920-K

**Instituciones:** Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad De Chile / Sección de Reumatología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile.

**Teléfonos:** 2978-6348/-6114, 9-78794903

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación: "Las células B reguladoras median la función reguladora de las células dendríticas a través de TIM-1, un posible mecanismo alterado en autoinmunidad" debido a que usted se encuentra diagnosticado con Artritis Reumatoide y cumple con los requisitos para donar 60 ml de sangre por punción venosa.

Nuestro proyecto de investigación se enfoca estudiar el rol de la interacción de las células B reguladora y las células dendríticas en la inducción de tolerancia y autoinmunidad.

**Objetivos:** Esta investigación tiene como objetivo evaluar el papel de una pequeña sub población de células B que posee una función reguladora (células B reguladoras), sobre otras poblaciones celulares como las células dendríticas y la interacción que existe entre ambas poblaciones de células del sistema inmune. El estudio evaluará si existe una interacción entre las células B reguladoras y las células dendríticas, si hay una alteración en la cantidad de esta sub población de células B reguladoras en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide, así como también se evaluará si existe una alteración en la interacción de las células B reguladoras y las células dendríticas en comparación a controles sanos.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar, necesitamos que se someta por una vez a: (indicar con una X)

\_\_\_ Una toma de 60 ml de sangre venosa periférica mediante una punción venosa en uno de sus antebrazos, realizada por personal profesional entrenado de la Unidad del Dolor del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El objetivo de esta muestra es evaluar la cantidad y función de las células B reguladoras en circulación.

El objetivo de esta muestra es evaluar la cantidad y función de las células B reguladoras en circulación.



09 ENE. 2018

**Riesgos:**

La punción venosa en un antebrazo puede acompañarse de los siguientes efectos indeseados: molestias en el sitio de punción, como dolor o hematomas. En forma muy poco frecuente pueden aparecer sensaciones de mareo, calambre, hormigueo, adormecimiento y entumecimiento.

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la punción venosa (cuando corresponda) deberá comunicarlo al Dr. Octavio Aravena en el teléfono celular 78794903.

**Costos:** La participación en este estudio es sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto. Todos los exámenes o prestaciones que no son necesarias para el estudio o tratamiento habitual de su enfermedad no serán financiados por este proyecto. Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio, seguimiento y tratamiento de su enfermedad.

**Beneficios:** Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no le traerá ningún beneficio.

**Alternativas:** Si Ud. decide no participar en esta investigación, usted no perderá ninguno de sus derechos o beneficios actuales.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación, mediante un sistema de números para cada individuo. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.



**Complicaciones:** En el improbable caso de que Ud. presente complicaciones directamente dependientes de la punción venosa, Ud. recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, financiado por el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigadora Principal: DR. OCTAVIO ARAVENA MADARIAGA Teléfonos: 2978-6347/-6114, 7-8794903. Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Investigadora Colaborador proyecto: DRA. LILIAN SOTO SAÉZ Teléfonos: 2978-6347.

Unidad del Dolor, Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico, Universidad de Chile

**Otros Derechos del participante:** En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", DR. MANUEL OYARZÚN GÓMEZ, Teléfono: 2978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia, Santiago.

Alternativamente con el Presidente del "Comité de Ética Científico y de Investigación" del Hospital Clínico. Teléfono: 2978 6923.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Las células B reguladoras median la función reguladora de las células dendríticas a través de TIM-1, un posible mecanismo alterado en autoinmunidad".



Nombre del Sujeto  
Rut:

Firma

Fecha



09 ENE. 2018

\_\_\_\_\_  
Nombre del Director o delegado  
Rut:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador  
Rut:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO (DONANTE SANO)**

### **Participación en estudio**

#### **"LAS CÉLULAS B REGULADORAS MEDIAN LA FUNCIÓN REGULADORA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS A TRAVÉS DE TIM-1, UN POSIBLE MECANISMO ALTERADO EN AUTOINMUNIDAD"**



**Grupo individuos sanos: Donación de Sangre ó de Concentrado Leucocitario desde Unidad de Sangre**

**Nombre del Investigador Principal:** DR. OCTAVIO ARAVENA MADARIAGA

**R.U.T.:** 12.315.484-3

**Investigadora Colaboradora HCUCH:** DRA. LILIAN SOTO SÁEZ

**R.U.T.:** 10.331.920-K

**Instituciones:** Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad De Chile / Sección de Reumatología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile.

**Teléfonos:** 2978-6348/-6114, 9-78794903

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación: "Las células B reguladoras median la función reguladora de las células dendríticas a través de TIM-1, un posible mecanismo alterado en autoinmunidad" debido a que cumple con los requisitos para ser considerado como control sano y donar 60 ml de sangre por punción venosa, o bien una donación de 450 ml de sangre venosa periférica. Nuestro proyecto de investigación se enfoca estudiar el rol de la interacción de las células B reguladoras y las células dendríticas en la inducción de tolerancia y autoinmunidad.

**Objetivos:** Esta investigación tiene como objetivo evaluar el papel de una pequeña sub población de células B que posee una función reguladora (células B reguladoras), sobre otras poblaciones celulares como las células dendríticas y la interacción que existe entre ambas poblaciones de células del sistema inmune. El estudio evaluará si existe una interacción entre las células B reguladoras y las células dendríticas, si hay una alteración en la cantidad de esta sub población de células B reguladoras en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide, así como también se evaluará si existe una alteración en la interacción de las células B reguladoras y las células dendríticas en comparación a los controles sanos, como es su caso.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar, necesitamos que se someta por una vez a: (indicar con una X)



\_\_\_ Una toma de 60 ml de sangre venosa periférica mediante una punción venosa en uno de sus antebrazos, realizada por personal profesional entrenado en la Unidad del Dolor del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El objetivo de esta muestra es evaluar la cantidad y función de las células B reguladoras en circulación.

\_\_\_ Una donación de 450 ml de sangre venosa periférica, mediante una punción venosa en uno de sus antebrazos, realizada por personal profesional entrenado. El procedimiento no le tomará mas de 30 minutos, tiempo en el cual usted permanecerá puncionado y cómodamente acostado en un sillón, a cargo de un Tecnólogo Medico preocupado que el procedimiento se lleve a cabo sin contratiempos. Una vez finalizado el procedimiento se le dejará descansar durante 5 a 10 minutos en el mismo sillón, si no se observan reacciones adversas se le solicitará se siente , y luego se pare con tranquilidad, si no está mareado podrá caminar a la sala de autoexclusión, para luego retirarse. De sentirse extraño o mareado por un tiempo mayor a 10 minutos, se le tomará los signos vitales (presión y pulso), dejándole recostado por tiempo mas prolongado hasta que pasen los síntomas descritos.

Usted podrá reanudar sus actividades normales dentro de 30 minutos, sin embargo no podrá fumar ni conducir ningún tipo de vehículo dentro de un período menor a 2 horas, asimismo no deberá actividad física dentro del resto del día y menos realizar ningún tipo de deporte extremo. La pérdida de volumen líquido se restaurará en forma progresiva y normal dentro de las próximas 24 hora.

**Riesgos:**

La punción venosa en un antebrazo puede acompañarse de los siguientes efectos indeseados: molestias en el sitio de punción, como dolor o hematomas. En forma muy poco frecuente pueden aparecer sensaciones de mareo, calambre, hormigueo, adormecimiento y entumecimiento.

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la punción venosa (cuando corresponda) deberá comunicarlo al Dr. Octavio Aravena en el teléfono celular 78794903.

**Costos:** La participación en este estudio es sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto.

**Beneficios:** Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio no le traerá ningún beneficio.

**Alternativas:** Si Ud. decide no participar en esta investigación, usted no perderá ninguno de sus derechos o beneficios actuales.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.



09 ENE. 2018

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación, mediante un sistema de números para cada individuo. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** En el improbable caso de que Ud. presente complicaciones directamente dependientes de la punción venosa, Ud. recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, financiado por el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigadora Principal: DR. OCTAVIO ARAVENA MADARIAGA Teléfonos: 2978-6347/-6114, 7-8794903. Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Investigadora Colaborador proyecto: DRA. LILIAN SOTO SAÉZ Teléfonos: 2978-6347.

Unidad del Dolor, Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico, Universidad de Chile

**Otros Derechos del participante:** En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", DR. MANUEL OYARZÚN GÓMEZ, Teléfono: 2978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia, Santiago.

Alternativamente con el Presidente del "Comité de Ética Científico y de Investigación" del Hospital Clínico. Teléfono: 2978 6923.





09 ENE. 2018

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Las células B reguladoras median la función reguladora de las células dendríticas a través de TIM-1, un posible mecanismo alterado en autoinmunidad".

\_\_\_\_\_  
Nombre del Sujeto  
Rut:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Director o delegado  
Rut:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador  
Rut:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 22 de Noviembre 2017.-

Señores

FONDECYT de Iniciación N° 11170800

**PRESENTE**

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dr. Octavio Alexis Aravena Madariaga , para su estudio el proyecto titulado "**REGULATORY B CELLS TIM-1 MEDIATED TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS FUNCTION, A POSSIBLE ALTERED MECHANISM IN AUTOIMMUNITY**" Laboratorio de Enfermedades Autoinmunes e Inflamatorias, Immune Regulation and Tolerance Research Group, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el cual cumple con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT "Bioseguridad 1ra edición,1994" y "Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4ª edición, Manual Bioseguridad en laboratorios , Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005, por tal motivo nuestra Unidad da el visto bueno para su realización.

El investigador responsable Dr. Octavio Alexis Aravena Madariaga, se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.

Tomé conocimiento: Dr. Octavio Alexis Aravena Madariaga

Ing. Elizabeth Quintanilla G.  
Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

c.c.

- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
- Investigador responsable, Dr. Octavio Alexis Aravena Madariaga
- Archivo



## ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 09 de Enero de 2018, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria Ejecutiva  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.  
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular  
Dra. María Angela Delucchi Biccocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.  
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Infectólogo  
Prof.<sup>a</sup> María Luz Bascuñán Psicóloga PhD, Prof. Asociado.

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado **“B REGULATORY CELLS TOLEROGENIC DENDRITIC CELL FUNCTION MEDIATED BY TIM-1; POSSIBLE ALTERATION MECHANISM IN AUTOIMMUNITY”**. Y cuyo investigador responsable es el Dr. Octavio Aravena Madariaga, quien desempeña funciones en el Laboratorio de Patología Autoinmune e Inflamatoria, I.C.B.M, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso.*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.*
- *Carta de aceptación de las autoridades de las instituciones en que se realizará el estudio.*
- *Consentimiento Informado.*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: Cautiva
- b) Utilidad del Proyecto: La información de ciencias básicas que se obtendrá en este proyecto podría a futuro utilizarse en terapia.
- c) Riesgos y Beneficios: los riesgos son aquellos que se produce en una toma de muestra de sangre de 60 ml o de un volumen mayor de 450 mL
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Si
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: Si está considerado



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**



09 ENE. 2018

- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto: Si  No  Tiempo estimado\_Nº de visitas 1
- g) Requiere seguimiento Site Visit : Si  No  Tiempo estimado\_Nº de visitas 1

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento Informado y Asentimiento Informado en su versión modificada recibida el 18 de Diciembre de 2017, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por este CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio: Laboratorio de Patología Autoinmune e Inflamatoria, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Santiago, 09 de Enero de 2018.



**Prof. Gina Raineri B.**  
**Secretaria Ejecutiva CEISH**

c.c: - Archivo Proyecto N° 167-2017.  
- Acta N° 126

**Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**