

Impacto de la subpoblación de monocitos Slan de controles sanos en la respuesta de células mononucleares expuesta a estímulos inflamatorios y cuerpos apoptóticos

Cristian Alberto Anacona-Trochez^{1,2}; Mauricio Rojas-López^{2,3}

RESUMEN

Introducción: Los monocitos, células derivadas de la médula ósea que circulan en sangre, tienen la capacidad de diferenciarse a macrófagos o células dendríticas. Participan en el control de las respuestas inmunes innatas, median y regulan las adaptativas, tienen alta plasticidad, son morfológica y funcionalmente muy heterogéneos.

Mediante la clasificación propuesta por Ziegler-Heitbrock, se definen, basándose en la expresión del CD14, correceptor del lipopolisacárido (LPS) y CD16, receptor de IgG, Fc-gamma IIIaR de baja afinidad, tres subpoblaciones: clásicos (CD14⁺⁺, CD16⁻), intermedios (CD14⁺, CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺, CD16⁺⁺).

Los monocitos no clásicos ostentan una heterogeneidad adicional. Shakel et al., reportaron un subgrupo de células que expresan una modificación de carbohidratos del ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1) con una unión de un azúcar denominado 6-sulfo LacNAc, modificación catalizada por la enzima carbonato sulfotransferasa-2 (CHST2), que une el azúcar a la molécula PSGL-1, denominándolas como monocitos Slan⁺.

Estudios del transcriptoma, sobre todo a nivel de células individuales, evidencian que los monocitos CD16⁺ Slan⁺ participan en procesos inflamatorios. Además, su elevada frecuencia en lesiones renales en pacientes con nefritis lúpica los implica como células

patogénicas que interactúan con complejos inmunes. Su elevado potencial para estimular la inmunidad innata y adaptativa, su capacidad de patrullar el endotelio, ser sensores de ácidos nucleicos, entre otras, hacen de ellos una subpoblación con características particulares que aún no han sido esclarecidas en condiciones normales y patogénicas.

Nuestro Grupo, contrario a la literatura, reportó que las células no clásicas regulan la activación linfocitaria. Además, los monocitos CD16⁺Slan⁺ no parecen tener una función equivalente a la de los monocitos CD16⁺Slan⁻, no es claro cuál es su papel en condiciones normales, ni en condiciones patológicas. Nuestro interés en los procesos inflamatorios crónicos nos impide a estudiar la respuesta en presencia y ausencia de los monocitos Slan⁺ mediante ensayos de depleción por separación electromagnética. Nos preguntamos, ¿Qué papel juegan los monocitos Slan⁺ en la respuesta inmune frente a estímulos autoinmunes como los cuerpos apoptóticos y estímulos inflamatorios como el LPS?

Para responder esta pregunta se plantea como objetivo general: "Analizar el efecto de los monocitos Slan⁺ sobre la respuesta a cuerpos apoptóticos y estímulos como LPS, mediante ensayos de depleción *in vitro* con separación electromagnética, a fin de conocer su papel diferencial en la modulación de la respuesta inmunitaria innata".

Se han realizado ensayos con estímulos con vesículas extracelulares (EV) de pacientes con artritis reumatoide (AR). Los monocitos se han obtenido a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos (PBMC) separados sobre Histopaque y posterior conteo de monocitos CD14⁺ por citometría de flujo, para sembrar 500,000 células CD14 por pozo en platos de 48 pozos.

El aislamiento de monocitos Slan⁺ se ha realizado con un estuche comercial (Miltenyi Biotec) partiendo de PBMC humanas, obteniendo porcentajes de pureza superiores al 90%, pero con baja eficiencia. Alternativamente, se ha implementado el aislamiento electromagnético usando el FACSaria III (Becton Dickinson), obtenido mejores rendimientos y purezas.

Luego de 24 horas se iniciaron los estímulos con EV e IFN-gamma a los cultivos con y carentes de Slan⁺ y se

¹ Estudiante Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en inmunología

² Grupo de Inmunología celular e Inmunogenética, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia (UDEA).

³ Unidad de Citometría de Flujo, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia (UDEA).

Correspondencia: Cristina Anacona; cristian.anacona@udea.edu.co

Financiación del proyecto: Proyecto financiado por Minciencias 111584467267, número de contrato: 925-2019

dejaron diferenciar durante ocho días en una atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, mediante citometría de flujo se midió la expresión de CD36, CD68, CD80, CD86 y HLA-DR. Se analizaron 3 individuos con dos proporciones diferentes de EV y posteriormente, se realizó una comparación de la fluorescencia media reportada para cada proporción de EV, encontrándose un aumento del HLA-DR y del CD36 en los cultivos con **células** Slan+ (p = 0,0177).

Además, se realizó la separación de células CD3+ autólogas, marcadas con CFSE, y posteriormente se agregaron a diferentes proporciones a los cultivos de monocitos carentes o no de las células Slan+ después de 24 horas de adherencia al plástico (Monocitos: linfocitos: 1:3 y 1:5). Estos cultivos se estimularon con lectina PHA y se incubaron 96 horas adicionales. Se analizó la dilución de CFSE en linfocitos mediante citometría de flujo. Se observó una marcada tendencia a incrementar la proliferación de células CD3+ en presencia monocitos Slan+, pero se requiere incrementar el número de observaciones.

Actualmente nos encontramos evaluando la respuesta a otros estímulos como el LPS y los resultados, aún preliminares, sugieren que la presencia de monocitos Slan+ incrementan la expresión del HLA-DR. Si los monocitos Slan+ tiene un efecto modulador positivo sobre la función de otros fagocitos y los linfocitos CD3+, requiere pruebas adicionales que nos permitan tener una aproximación al mecanismo por el cual estas células tienen su efecto modulador.

BIBLIOGRAFÍA

- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*. 2014.
- Khan A, Singh VK, Hunter RL, Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019.
- Rojas J, Salazar J, Martínez MS, Palmar J, Bautista J, Chávez-Castillo M, et al. Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis. *Scientifica (Cairo)*. 2015.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010.
- van Leeuwen-Kerkhoff N, Lundberg K, Westers TM, Kordasti S, Bontkes HJ, de Gruijl TD, et al. Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan+ non-classical monocytes and myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2017.
- Hofer TP, Zawada AM, Frankenberger M, Skokann K, Satz AA, Gesierich W, et al. Slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: Impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood*. 2015.
- Olaru F, Döbel T, Lonsdorf AS, Oehr S, Maas M, Enk AH, et al. Intracapillary immune complexes recruit and activate slan-expressing CD16+ monocytes in human lupus nephritis. *JCI insight*. 2018.
- Ramírez-Agudelo ME, Caro AC, Jaramillo CAP, Rojas M. Fatty acid profile during the differentiation and infection with Mycobacterium tuberculosis of mononuclear phagocytes of patients with TB and healthy individuals. *Cell Immunol*. 2011;270(2).
- Hofer TP, van de Loosdrecht AA, Stahl-Hennig C, Casatella MA, Ziegler-Heitbrock L. 6-Sulfo LacNAc (Slan) as a Marker for Non-classical Monocytes. *Frontiers in Immunology*. 2019.
- Burbano C, Vasquez G, Rojas M. Modulatory effects of cd14+cd16++ monocytes on cd14++cd16- monocytes: A possible explanation of monocyte alterations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2014.