

# EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA Y AISLAMIENTO DE SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS EN PACIENTES CON NEFRITIS LÚPICA SEGÚN LA FASE DE TRATAMIENTO POR CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ESTUDIOS TRANSCRIPCIONALES

Paula X. Losada<sup>1</sup>, Karen Álvarez<sup>1</sup>, Juan Camilo Díaz<sup>2</sup>, Ricardo Pineda<sup>2</sup>, Adriana Vanegas<sup>3,4</sup>, Mauricio Rojas<sup>1,5</sup>, Gloria Vásquez<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, GICIG, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>ARTMEDICA, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Grupo de Reumatología, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia.

<sup>4</sup>Hospital San Vicente Fundación, Medellín-Colombia.

<sup>5</sup>Unidad de citometría de flujo, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia.

Tipo de investigación: Básica aplicada.

Contacto ponente: paula.losada@udea.edu.co

Financiación del proyecto: Minciencias 111584467267 contrato 925-2019.

Los monocitos se clasifican según la expresión en superficie de CD14, CD16 y SLAN. Los monocitos CD16+ disminuyen en circulación de pacientes LES y los CD16+SLAN+ (MoSLAN) se acumulan en riñón de pacientes con Nefritis Lúpica (NL)<sup>1,2</sup>. El tratamiento de la NL se caracteriza por dos fases: inducción y mantenimiento, con diferencias en la intensidad de inmunosupresión. Conocer la frecuencia de las subpoblaciones de monocitos podría ser clave en el entendimiento de la NL<sup>3-5</sup>. Se desconoce cómo se comportan estas células durante las fases de tratamiento. La clasificación y obtención de las subpoblaciones para estudios *ex vivo* en pacientes bajo tratamiento representan un reto, la citometría de flujo puede contribuir en facilitar este abordaje.

**Objetivo:** Evaluar la distribución de subpoblaciones de monocitos de controles, pacientes con LES y LES+NL según la fase de tratamiento y aislar monocitos SLAN+/- mediante citometría de flujo para posteriores estudios transcripcionales.

**Metodología:** Se incluyeron mujeres con diagnóstico de LES (n=20) y LES+NL (n=17) atendidas en el centro médico ARTMÉDICA y voluntarios sanos (n=20) con firma del consentimiento informado. El grupo de LES+NL fue clasificado en fase de inducción (n=5) y mantenimiento (n=12). La fenotipificación, distribución y separación electromagnética de subpoblaciones de monocitos se realizó en los citómetros BD RLSFortessa y FACSAria III según los parámetros SSC, FSH y expresión en superficie de CD14, CD16, HLA-DR y SLAN. Los datos se analizaron con FACSDiva y FlowJo. Luego de la separación, el RNA de cada fracción fue obtenido con kits comerciales para posterior análisis transcriptómico.

**Resultados:** Los participantes fueron mujeres con edad promedio de 37 y 31 años con LES y LES-NL, respectivamente. 52% de pacientes con LES-NL tienen NL clase III-IV. 29% fueron tratadas con dosis altas de Ciclofosfamida. Se observó una frecuencia reducida de monocitos CD16+ en pacientes LES y LES+NL. SLAN se expresa en monocitos CD14-CD16+, su frecuencia disminuye en pacientes LES, y en la fase de inducción de la NL. La separación electromagnética de  $3 \times 10^6$  de MoCD14SLAN- y MoSLAN, con pureza superior al 90% y ha permitido la obtención de hasta 4 µg RNA para futuros análisis transcripcionales.

**Conclusión:** La frecuencia de MoSLAN disminuye en los pacientes con LES y LES+NL y entre las fases de tratamiento. La citometría de flujo facilita el estudio de las subpoblaciones de monocitos en circulación de pacientes con NL. Permite la obtención de subpoblaciones celulares con recuentos bajos (MoSLAN) con viabilidad y calidad adecuada para la posterior obtención de RNA para estudios transcripcionales los cuales permitirán evaluar la expresión de genes en monocitos los cuales pudieran ser relevantes en la inmunopatología de la NL.

Los autores están de acuerdo con el trabajo y declaran no tener conflicto de intereses.

## **Bibliografía**

1. Barrera García A, Gómez-Puerta JA, Arias LF, et al. Infiltrating CD16+ Are Associated with a Reduction in Peripheral CD14+CD16++ Monocytes and Severe Forms of Lupus Nephritis. *Autoimmune Dis.* 2016;2016
2. Olaru F, Döbel T, Lonsdorf AS, et al. Intracapillary immune complexes recruit and activate slan-expressing CD16+ monocytes in human lupus nephritis. *JCI Insight.* 2018;3(11)
3. Arazi A, Rao DA, Berthier CC, et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis. *Nat Immunol.* 2019;20(7):902-914
4. Kuriakose J, Redecke V, Guy C, et al. Patrolling monocytes promote the pathogenesis of early lupus-like glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 2019;129(6):2251-2265
5. Nomura A, Mizuno M, Noto D, et al. Different Spatial and Temporal Roles of Monocytes and Monocyte-Derived Cells in the Pathogenesis of an Imiquimod Induced Lupus Model. *Front Immunol.* 2022;0:1007
6. Burbano C, Rojas M, Vásquez G, Castaño D. Microparticles That Form Immune Complexes as Modulatory Structures in Autoimmune Responses. *Mediators Inflamm.* 2015;2015
7. Mobarrez F, Fuzzi E, Gunnarsson I, et al. Microparticles in the blood of patients with SLE: Size, content of mitochondria and role in circulating immune complexes. *J Autoimmun.* 2019;102:142-149
8. Zhao Y, Wei W, Liu ML. Extracellular vesicles and lupus nephritis - New insights into pathophysiology and clinical implications. *J Autoimmun.* 2020;115