

Trampas extracelulares de neutrófilos y células dendríticas plasmacitoides como inductores del lupus.

¹Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Autónoma Benito
Juárez de Oaxaca.

²Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca.

Torres-Aguilar H,¹ García-Olivera I,² Bibiano-Baños JI,¹ Sosa-Luis SA¹

Resumen

Introducción: El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-ADN, los cuales forman complejos inmunes causando lesiones en múltiples órganos. Actualmente, el origen de la pérdida de tolerancia al ADN propio no está bien dilucidado.

Material y Métodos: En un estudio pareado por edad y género, a partir de 20 individuos sanos y 20 pacientes con LES, se purificaron neutrófilos por gradiente de percoll y células dendríticas plasmacitoides (pDC) por separación celular magnética. Se evaluó la producción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET's) después de co-cultivarlos con pseudohifas de *Candida albicans*, mediante microscopía de fluorescencia e imagenología y por cuantificación espectrofotométrica. Simultáneamente, se analizó el estado de activación de las pDC por su expresión de CD40 mediante citometría de flujo.

Resultados: Los pacientes con LES mostraron leucopenia con linfopenia absoluta, sin anemia ni disminución en el número absoluto de neutrófilos, pero con mayor susceptibilidad de estos a liberar ADN (emisión de NET's), este efecto correlacionó con el estado de activación de sus pDC.

Conclusiones: El ADN liberado en exceso por los neutrófilos de los pacientes con LES podría ser capturado por receptores de sus pDC (TLR-7 y 9), romper la tolerancia al ADN propio, estimulando linfocitos B para producir anticuerpos anti-ADN. La implementación de estrategias que eviten la activación de los neutrófilos (profilaxis con inhibidores de NET's) y pDC (anti-BDCA-2) en individuos genéticamente susceptibles, podría evitar el desarrollo o exacerbación del LES.

Palabras Clave: Lupus Eritematoso Sistémico, Neutrófilos, Células Dendríticas Plasmacitoides, Autoinmunidad.

Extracellular neutrophil traps and plasmacytoid dendritic cells as lupus inducers.

Abstract

Introduction: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the presence of anti-DNA antibodies presence producing immune complexes and causing lesions in multiple organs. Currently, the origin of the loss of tolerance to one's own DNA is not well understood.

Material and Methods: In an age and gender matched study of 20 healthy individuals and 20 SLE patients, neutrophils was purified by percoll gradient and plasmacytoid dendritic cells (pDC) by magnetic cell separation. The production of Neutrophils Extracellular Traps (NET's) was evaluated after co-cultivating with pseudohyphae of *Candida albicans* by mean of fluorescence microscopy and image analysis, and by spectrophotometric quantification. Simultaneously, pDC activation state was analyzed by CD40 expression by flow cytometry.

Results: SLE patients presented leukopenia with absolute lymphopenia, absence of anemia or decreased absolute number of neutrophils, but with higher susceptibility to DNA releasing (NET's emission), and this effect correlated with their pDC activation state.

Conclusions: the excessive DNA releasing from neutrophils in SLE patients might be captured by pDC receptors (TLR-7 and 9), breaking tolerance to own DNA, stimulating auto reactive B lymphocytes to produce anti-DNA antibodies. The implementation of strategies preventing neutrophils activation (prophylaxis with NET's inhibitors) and pDC (anti-BDCA-2) in genetically susceptible individuals, could prevent the development or exacerbation of SLE.

Key words: Lupus Erythematosus Systemic, Neutrophils, Dendritic Cells, Autoimmunity.



Introducción

Una de las principales células efectoras de la inmunidad innata contra bacterias extracelulares y hongos son los neutrófilos. Sus mecanismos efectores radican en la fagocitosis y destrucción de los microorganismos mediante el uso de enzimas líticas y especies reactivas del oxígeno. Pero si el cuerpo es invadido por un gran número de microorganismos, o tan grandes que los neutrófilos no puedan fagocitar, entonces expulsan su ADN con enzimas líticas para capturar y degradarlos externamente. A este proceso se le denomina muerte por NETosis debido a la emisión de Trampas Extracelulares de Neutrófilos o NET's (del inglés, *Neutrophyls Extracellular Traps*). Una activación excesiva o inadecuada de los neutrófilos por este mecanismo puede provocar daños en los tejidos y conducir a una reacción inflamatoria crónica.^{1,2,3}

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por una producción de anticuerpos dirigidos contra ADN, induciendo la formación de complejos antígeno-ADN que precipitan y dañan el endotelio vascular de múltiples tejidos.^{4,5,6} Se ha especulado que la liberación de ADN puede deberse a infecciones fuertes o crónicas con destrucción masiva de células propias, con un probable incremento de liberación de NET's por parte de los neutrófilos, lo que ocasionaría que las concentraciones de ADN sobrepasen el umbral de concentración y rompan con los mecanismos de degradación y mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia el material genético propio (DNAsas, RNAsas, metilaciones) y esto conlleve a la formación de inmunocomplejos (IC) los cuales al ser capturados por las Células Dendríticas Plasmacitoides (pDC's) mediante sus receptores TLR-7 y TLR-9, las activaría favoreciendo la secreción de IFN- α .^{7,8}

En este proyecto, evaluamos el estado de activación de las pDC y la susceptibilidad de los neutrófilos de pacientes con LES para emitir trampas extracelulares, en un estudio pareado en edad y género con individuos sanos. Con la finalidad de vislumbrar la participación de estas células en la fisiopatología de esta enfermedad.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que puede llegar a ser incapacitante debido a que afecta la sobrevivencia y la calidad de vida de quien lo padece al comprometer distintos órganos. Se estima que en México, lo padecen 1.5 millones de personas, principalmente mujeres en edad fértil, pero su frecuencia podría estar subestimada debido a que el tiempo para llegar a un diagnóstico es de dos a cinco años.⁹ En ese lapso, la aplicación de tratamientos erróneos puede agravar la enfermedad, pero el uso de profilaxis correcta y oportuna podría evitar complicaciones o su desarrollo en pacientes genéticamente susceptibles.

Con la intención de diagnosticar oportunamente y prevenir el desarrollo de efectos incapacitantes, la comunidad científica ha tratado de describir factores genéticos que pueden predisponer a esta enfermedad, describiendo haplotipos de susceptibilidad en diferentes genes. Sin embargo, su presencia explica menos del 10% de los casos. Estas evidencias, sugieren la existencia de factores externos o ambientales tales como infecciones virales, factores dietéticos y tóxicos, que pueden activar factores intrínsecos de las personas con predisposición genética para desencadenar el desarrollo de esta enfermedad. Por lo tanto, el descubrimiento de marcadores biológicos que revelen el momento preciso cuando se pierde el balance entre la tolerancia a lo propio y el inicio del daño en el organismo podría abarcar un espectro más amplio de detección oportuna para la prevención, monitoreo y tratamiento del LES. El objetivo del estudio fue evaluar la susceptibilidad de los neutrófilos de los pacientes con LES para producir trampas extracelulares en correlación con el estado de activación de las pDC, en comparación a individuos sanos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, el tamaño de la población se estableció con un muestreo aleatorio por conveniencia con base a los criterios de selección, pareado por edad y género entre 20 pacientes con LES y 20 individuos sanos.

Muestra: 20 mL de sangre total periférica con anticoagulante (EDTA), obtenida bajo consen-

DETALLES DEL ARTÍCULO

Recibido: 10/agosto/2018
Aceptado: 20/septiembre/2018

Cómo citar este artículo:

Torres-Aguilar H, García-Olivera Imelda, Bibiano-Baños JI, Sosa-Luis SA. Trampas extracelulares de neutrófilos y células dendríticas plasmacitoides como inductores del lupus. *Avan C Salud Med* 2018; 5 (4):108-119.

miento informado. Se les realizó una biometría hemática completa utilizando un Citómetro automatizado Advia 60.

La investigación se realizó en pacientes diagnosticados con LES con positividad para anticuerpos anti-ADN, proporcionados por el departamento de reumatología del Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca (HRAEO). Bajo autorización previa del Comité de Bioética e Investigación del Hospital.

Purificación de neutrófilos y Células dendríticas plasmacitoides.

Los neutrófilos se purificaron a partir de la sangre total por gradiente de ficoll (*Lymphoprep*, densidad 1.077 g/mL) y percoll (*Biotechnology*, densidad 1.082 d/mL). Los eritrocitos contaminantes se eliminaron por choque osmótico con solución salina al 0.2% en baño de hielo. A partir de las células mononucleares, se marcaron con un kit de selección negativa de anticuerpos conjugados con microesferas magnéticas (*Plasmacytoid Dendritic Cell Cocktail II*, *Miltenyi Biotec*) y se hizo uso del sistema Magnetic Cell Sorting. Las células vivas obtenidas fueron cuantificadas con azul de tripano. Para analizar su morfología fueron visualizadas con tinción de Wright y análisis fenotípico.

Análisis fenotípico de las pDC.

Para la identificación de pDC, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti BDCA-2 conjugado con Fluoresceína (FITC), (*Miltenyi Biotec*). Para evaluar su estado de activación se analizó la expresión de CD40 con un anticuerpo monoclonal conjugado con Ficoeritrina (PE) (*Miltenyi Biotec*). Y se analizaron por citometría de flujo (*Cytoflex-BeckmanFlow*) y el software *Flowjo*.

Inducción, cuantificación y análisis de trampas extracelulares de los neutrófilos.

Se utilizaron 6 pocillos de una placa para cultivo de 24 pocillos, tres pocillos se utilizaron para la cuantificación de ADN por espectroscopia óptica y tres pozos con cubreobjetos estériles al fondo para análisis por fluorescencia. En el pozo 1 se colocaron 6x10³ neutrófilos; en el pozo 2 se colocaron 2x10³ pseudohifas y en el pozo 3 se colocaron 6x10³ neutrófilos con 2x10³ pseudohifas. Las

células fueron colocadas en un volumen total de 500 μ L de medio RPMI sin antimicóticos para el análisis por fluorescencia y en 500 μ L de PBS para la cuantificación de ADN y fueron incubadas por 3 horas a 37°C / 5% CO₂. El análisis de ADN liberado fue cuantificado por espectroscopia óptica a 260 nm en cubetas de cuarzo con blanco de PBS y la cuantificación se realizó midiendo la absorbancia del pocillo 3, menos las absorbancias del pozo 1 y 2. La observación de las trampas extracelulares se realizó tiñendo con bromuro de etidio y observando al microscopio de fluorescencia (*Carl Zeiss*). El análisis por imagenología se realizó con el software MATLAB®.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la prueba de *t de Student* y coeficiente de correlación de *Pearson*, los cuales son utilizados para el análisis de dos poblaciones independientes y pareadas con iguales varianzas.

Resultados

Los resultados presentados a continuación forman parte de un proyecto integral en donde se analizaron múltiples características fenotípicas y funcionales tanto de los neutrófilos como pDC de pacientes con LES en comparación a las mismas células de individuos sanos (ej. Descripción de marcadores asociados a la función inmunogénica y tolerogénica de las pDC, secreción de IFN- α , capacidad estimuladora, especies reactivas del oxígeno, etc). Se muestran los más representativos y sobresalientes.

El muestreo de los pacientes con LES fue representativo en comparación a lo reportado para esta enfermedad. El análisis de los datos de la historia clínica y de los resultados obtenidos de la biometría hemática realizada en el momento del muestreo, mostraron que el tipo de LES más frecuentes fue el cutáneo y articular, con hipotiroidismo y síndrome antifosfolípidos como enfermedades autoinmunes asociadas (Tabla 1). Presentándose más frecuentemente en los rangos de edad de 31 a 50 años. Tomando en cuenta que el promedio de años con el diagnóstico fue de 7 años, afecta más a mujeres en edad reproductiva. Se muestrearon 19 mujeres y un varón. Estos datos indican que el muestreo de los pacientes coincidió con las frecuencias reportadas en la literatura.⁹

Tabla 1. Datos generales de los pacientes con SLE. Se muestran edades, género, años con el diagnóstico, principales afecciones y tratamiento recibido. DM2: Diabetes mellitus tipo 2, IVP: Insuficiencia Venosa Periférica, HAS: Hipertensión arterial sistémica, SAF: Síndrome Antifosfolípidos: y PI: Post incisional.

Px	Género	Edad	Dx(años)	Afección	Tratamiento
1	Femenino	53	9	LES	Prednisona
2	Femenino	56	4	LES Articular, cutáneo, DM2, IVP, esteatosis Hepática	Prednisona, Metotrexate
3	Femenino	18	6	LES Articular	Prednisona, Metotrexate, Pantoprazol
4	Femenino	42	11	LES Cutáneo, Neuropatía periférica, HAS, hepatotoxicidad	Prednisona, Azulfidina, Cloroquina, Leflunomida
5	Femenino	75	6	LES Cutáneo, Vasculitis, HAS	Prednisona, Azatioprina, Acido Alendrónico
6	Femenino	50	4	LES Cutáneo, Hematológico, Articular, Gonartrosis	Aziatropina, Cloroquina, Telmisartán
7	Masculino	36	10	LES Neurológico, Secuelas Mielitis Transversa	Aziatropina, Valproato de Magnesio
8	Femenino	50	6	LES Cutáneo, Articular, Compromiso órganos y sistemas, HAS	Metotrexate, Azulfidina, Plaquenil, Meloxicam
9	Femenino	32	6	LES Cutáneo, Articular, Síndrome de Sjögren asociado	Cloroquina, Metotrexate, Prednisona
10	Femenino	43	14	LES Articular, HAS, Obesidad II, Fibromialgia	Sertralibna, Indometacina
11	Femenino	52	9	LES Hematológico, Miopatía Lúpica	Azatioprina, Pregabalina
12	Femenino	39	9	LES Articular	Cloroquina, Metotrexate, Indometacina
13	Femenino	26	1	LES Articular	Metotrexate, Cloroquina
14	Femenino	42	7	LES, Sinovitis, Hipotiroidismo, Distimia	Metotrexate, Azulfidina, Piroxicam
15	Femenino	38	7	LES Cutáneo, Articular, Hipotiroidismo Anemia hemolítica	Prednisona, Cloroquina, Azatioprina
16	Femenino	34	4	LES Cutáneo, Articular, Inducida por drogas, Distimia	Prednisona, Cloroquina, Metotrexate
17	Femenino	41	8	LES Cutáneo, Articular, Cloroquina	Prednisona, metotrexate, Azulfidina, Leflunomida,
18	Femenino	57	28	LES Cutáneo, Articular, Osteoporosis, Enfermedad Diverticular Complicada	Pregabalina, Ácido Alendrónico, Cloroquina
19	Femenino	35	4	LES Cutáneo, Articular,	Azulfidina, Metotrexate
20	Femenino	45	1	LES Cutáneo, Articular, SAF, Síndrome Cushing, Glaucoma, HAS, Hernia PI	Prednisona, Azatioprina, Losartan, Nifedipino.

El análisis de los datos de la biometría hemática, pareado en edad y género de los pacientes con LES y los individuos sanos, mostró que aunque se aprecia una tendencia de los pacientes con LES de tener valores de hemoglobina por debajo del límite inferior, no hubo diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a los números de los leucocitos totales los pacientes con LES si mostraron leucopenia estadísticamente significativa, con linfopenia absoluta, pero sin neutropenia significativa (Figura 1).

Las pDC de los pacientes con LES se encuentran más activadas a pesar del tratamiento con inmunosupresores. El análisis morfológico de las pDC purificadas por selección negativa de la separación celular magnética mostró células redondeadas sin dendritas en circulación, con núcleo abundante y citoplasma basofílico, con características similares a las reportadas en la literatura. (Figura 2).¹⁰

El análisis fenotípico de estas células por citometría de flujo, utilizando como marcador exclusivo

de pDC a BDCA-2,¹¹ reveló que tanto los individuos sanos y los pacientes con LES, se pueden dividir en dos grupos. Personas con porcentajes de pDC en células mononucleares de sangre periférica menores al 10% y personas con porcentajes por arriba del 20% (Figura 3). La bibliografía actual que describe los valores de referencia de los porcentajes de pDC en humanos, los ha establecido con base al número de células mononucleares purificadas de sangre periférica (de alrededor del 0.2 - 0.8 %).¹² Sin embargo, dada su baja frecuencia estimada con respecto a leucocitos totales (<0.01%) no se han reportado estos valores. Debido a que en este estudio se cuantificaron leucocitos totales, los valores absolutos de pDC's que se obtuvieron fueron de 0.0108 ± 0.0063 para los pacientes con LES y de 0.0179 ± 0.015 , para los individuos sanos, sin existir diferencias significativas ($p=0.092$). Sin, embargo, independiente del porcentaje de pDC en sangre periférica de ambas poblaciones definidas por la expresión de BDCA-2, a pesar de estar en tratamiento con medicamentos inmunosupresores, las pDC de los pacientes con LES mostraron una mayor expresión estadística-

Figura 1. Distribución pareada en edad y género de los valores de A) Hemoglobina, B) Leucocitos totales, C) Valor absoluto de linfocitos y C) Neutrófilos de los pacientes con LES y sanos. Las líneas punteadas establecen los valores de referencia. * indica un valor de $p \leq 0.05$, estadísticamente significativo.

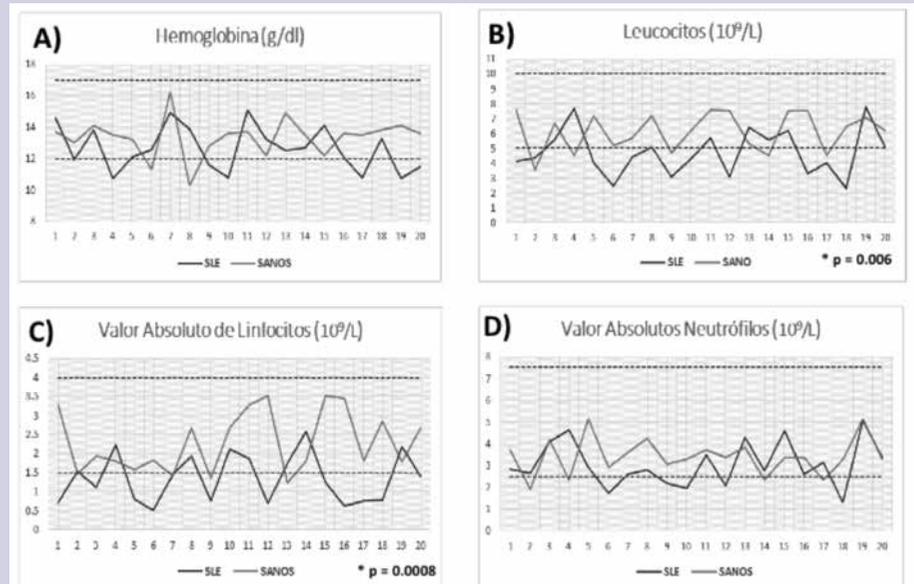


Figura 2. A) imagen de referencia (Tai Fei, 2010. B) pDC's obtenidas por separación celular magnética, selección positiva. Tinción de Wright, Microscopía óptica (100x).

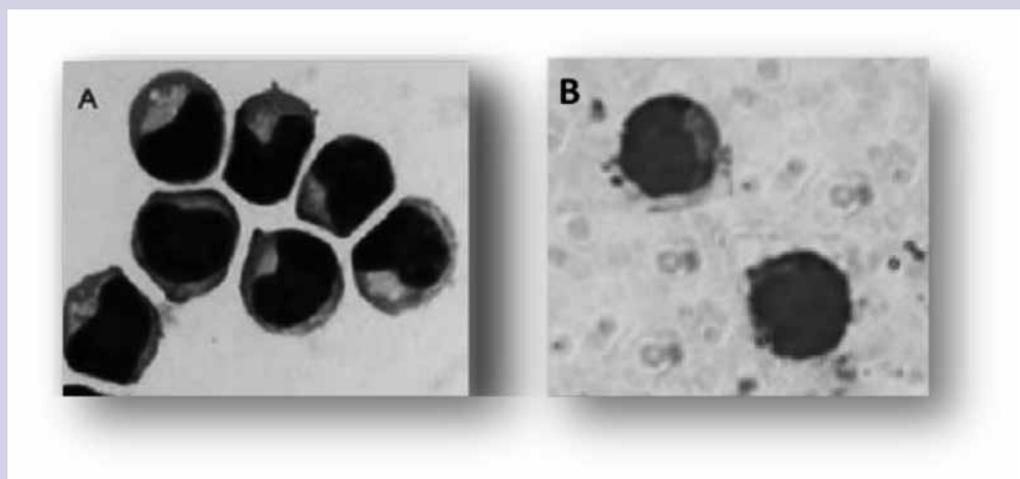


Figura 3. El porcentaje de expresión de BDCA-2 divide a la población general en dos grupos. Se muestran resultados representativos, A) Se representa el bajo porcentaje de células BDCA-2 + en los pacientes con SLE. B) Alto porcentaje de células BDCA-2+ en pacientes con SLE. C) Bajo porcentaje de BDCA-2 en las células de los individuos sanos. D) población bien definida por un alto porcentaje de células BDCA-2+ en los individuos sanos.

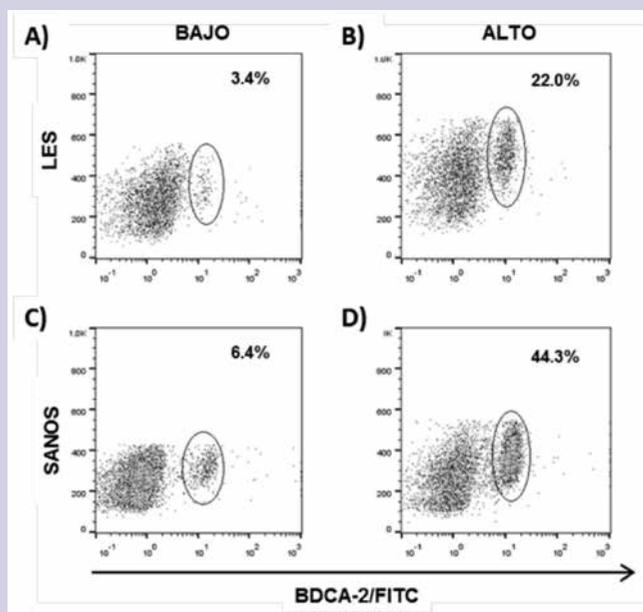


Figura 4. IMF de la expresión de CD40 en células BDCA-2+. Análisis pareado en edad y género de los pacientes con LES e individuos sanos. * indica un valor de $p \leq 0.05$, estadísticamente significativo.

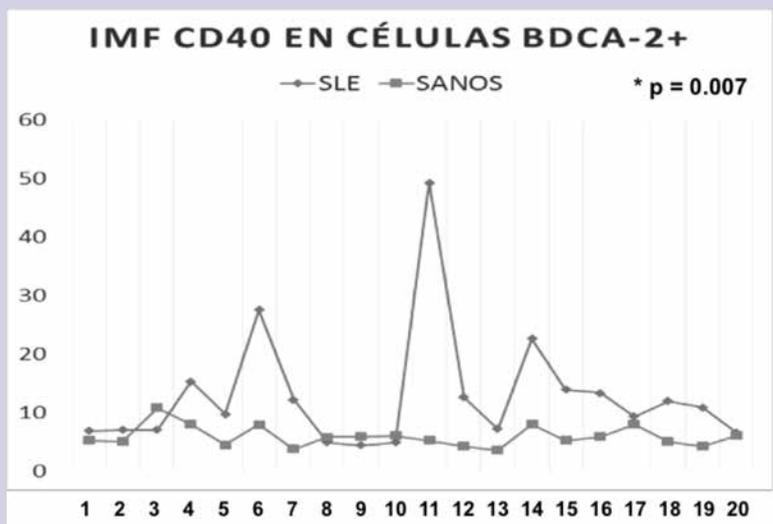


Figura 5. Pureza, viabilidad y tinción de las células purificadas. A) Neutrófilos, tinción de Wright 100X, B) Neutrófilos, viabilidad con azul de tripano 40X, C) Tinción de neutrófilos con bromuro de etidio, microscopía de fluorescencia. D) tinción con azul de tripano de pseudohifas de *C. albicans* 40X. E) Tinción de las pseudohifas con bromuro de etidio, microscopía de fluorescencia.

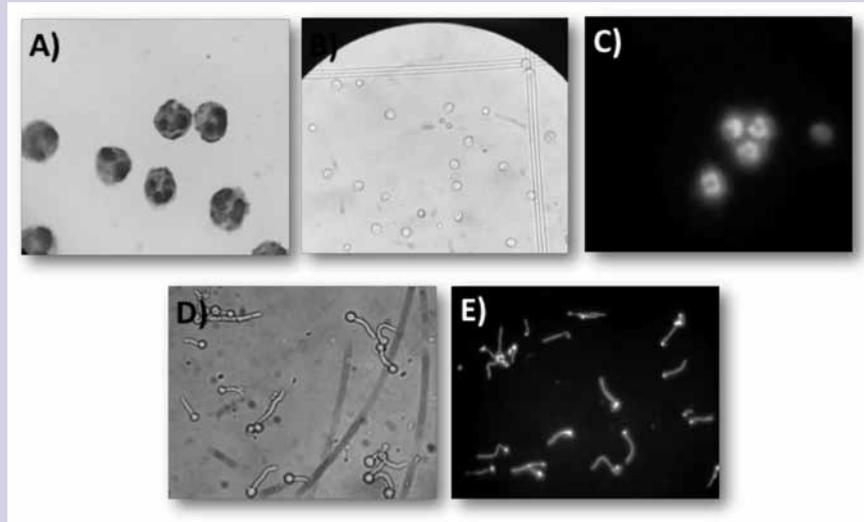


Figura 6. Análisis cuantitativo de imágenes mediante el software MATLAB®. Extracción de los tres colores principales: A) Rojo, B) Verde y C) Azul. Las trampas extracelulares estaban formadas por canales rojos y verdes, y el canal azul estaba presente solo en el núcleo. D) Las áreas con ADN expulsado se delimitaron eliminando el fondo que contenía píxeles rojos residuales, se eliminaron el canal azul y el núcleo para evitar interferencias. E) Conversión en una escala de blanco y negro donde solo se seleccionaron las intensidades que contienen ADN para la cuantificación de los píxeles. F) Fusión de la imagen blanca y original que muestra que los píxeles blancos de E) representan el ADN expulsado y evitan la interferencia de fondo.

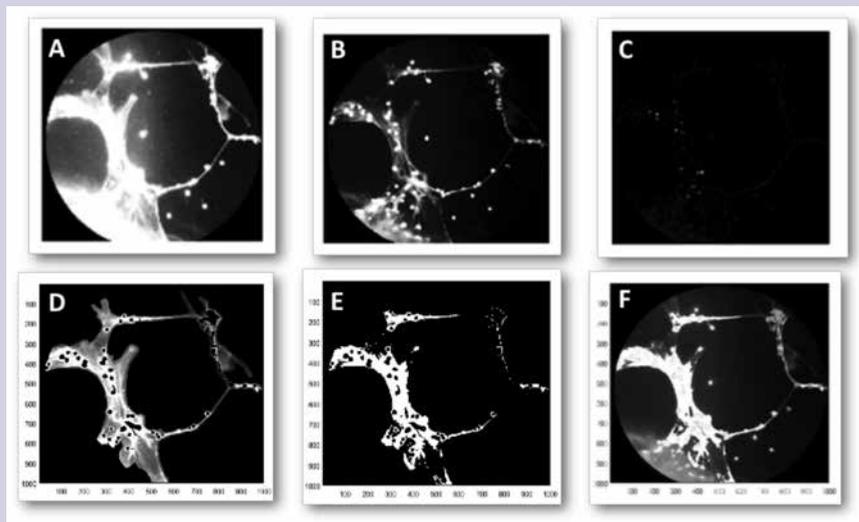


Figura 7. Cuantificación de la densidad de píxeles por MATLAB®. Densidad de píxeles en las imágenes obtenidas de los cocultivos de neutrófilos y pseudohifas. Valor de $p \leq 0.05$, estadísticamente significativo.

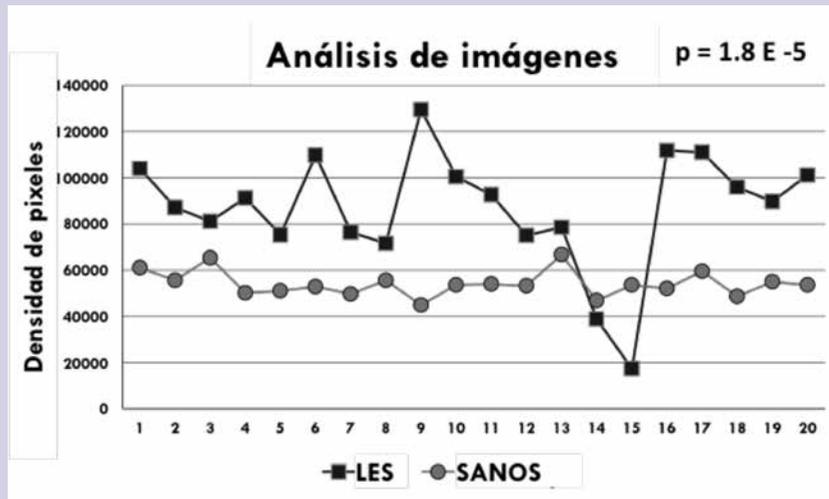


Figura 8. Emisión de ADN por los neutrófilos. Absorbancias a 260 nm del medio de los cocultivos de neutrófilos y pseudohifas, después de restarles las absorbancias de los neutrófilos y pseudohifas por separado. * indica un valor de $p \leq 0.05$, estadísticamente significativo.

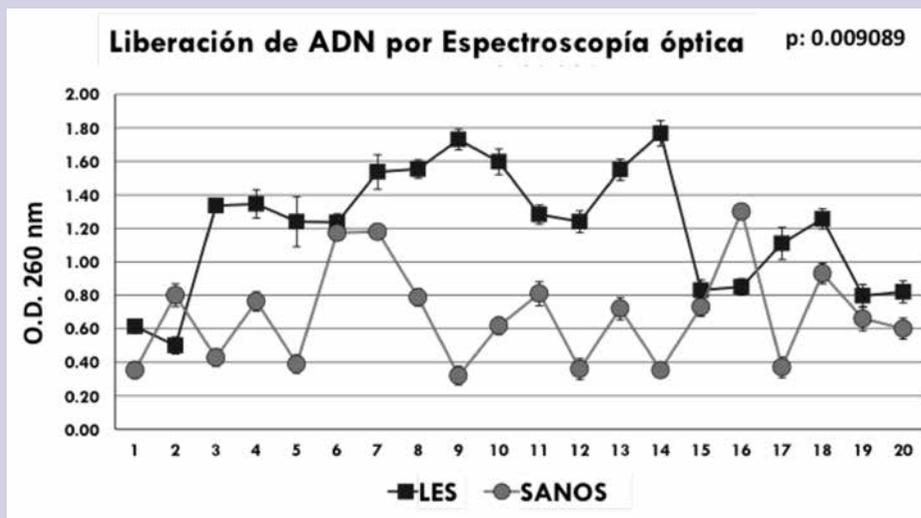
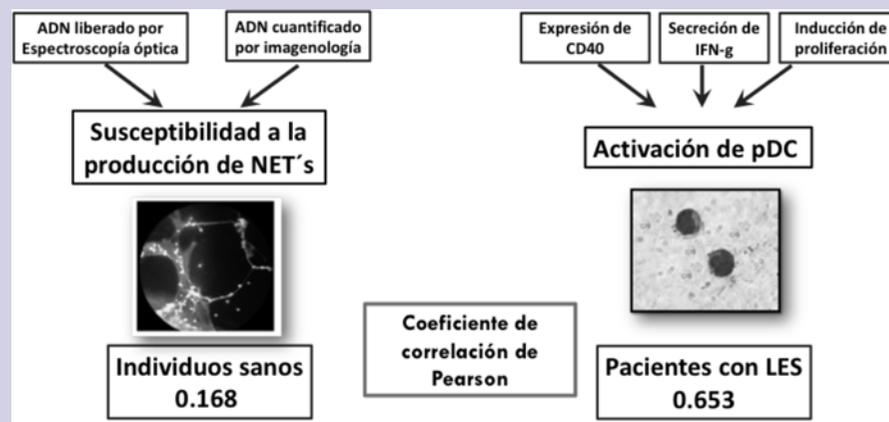


Figura 9. Coeficiente de correlación de Pearson. Análisis de correlación entre los valores numéricos de las variables que describen la susceptibilidad de los neutrófilos para la emisión de NET's con los valores numéricos que definen el estado de activación de las pDC.



mente significativa de CD40 (Intensidad Media de Fluorescencia), como marcador de activación, en comparación a los individuos sanos (Figura 4).

Los neutrófilos de los pacientes con LES son más susceptibles a liberar trampas extracelulares. La purificación de neutrófilos por gradiente de ficoll y percoll, el análisis de viabilidad con tinción de azul de tripano, la obtención de pseudohifas de *C. albicans* y la tinción con bromuro de etidio, mostró poblaciones celulares puras, adecuadas para la evaluación de trampas extracelulares (Figura 5).

Debido a que los píxeles son unidades que representan un punto mínimo en cada imagen compuesta de tres canales de color principales (rojo, verde y azul), se extrajeron los tres canales principales de color (Figura 6. A, B y C, respectivamente), notando que las trampas extracelulares estaban formadas principalmente por canales rojos y verdes, y el canal azul estaba presente solo en el núcleo. La extracción de canales convierte colores en una escala de intensidades de grises, que van de una a 255 unidades. Las intensidades son di-

rectamente proporcionales a la cantidad del canal primario contenido. Las áreas con ADN expulsado se delimitaron eliminando el fondo que contenía píxeles rojos residuales. El canal azul y el núcleo se eliminaron para evitar la interferencia del ADN nuclear durante la cuantificación (Figura 6D). En estas imágenes, persistía el fondo gris que rodeaba el ADN expulsado; por lo tanto, impedía la cuantificación de píxeles para medir las trampas extracelulares. Por lo tanto, las imágenes se convirtieron en una escala en blanco y negro donde solo se seleccionaron las intensidades que contenían ADN y se cuantificó el número de píxeles en el color blanco (Figura 6E). La sobre posición de las imágenes blanca y la original muestra que los píxeles blancos representan solo el ADN expulsado en la imagen original y evitan la interferencia de fondo (Figura 6F). La cuantificación de píxeles en imágenes como la figura 6E, permite una cuantificación de ADN liberada específica sin interferencia de otras moléculas.

El análisis cuantitativo de imágenes de la emisión de trampas extracelulares mostró una mayor producción por parte de los neutrófilos de los pacien-



tes con LES, observada por una mayor densidad de píxeles y un mayor número de neutrófilos expulsando el ADN (Figura 7).

El análisis cuantitativo por espectrofotometría del ADN liberado al medio en los cocultivos de neutrófilos con pseudohifas y restando las absorbancias del medio con neutrófilos o pseudohifas solas, mostró diferencias estadísticamente significativas en la liberación de ADN de los neutrófilos de los pacientes con LES en comparación a los individuos sanos (Figura 8).

El estado de activación de las pDC de los pacientes con LES muestra una mayor correlación con la susceptibilidad de los neutrófilos para emitir NET's. Para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson, se tomaron los valores numéricos de cada una de las variables que evaluaron la susceptibilidad de los neutrófilos para emitir NET's y se compararon con el valor numérico de las variables que analizaron el estado de activación de las pDC (Figura 9). Debido a que un valor de coeficiente de Pearson más cercano a 1.0 indica una mayor correlación entre las variables, este resultado nos indica que en los pacientes con LES el estado de activación de sus pDC muestra una mayor correlación con la capacidad de sus neutrófilos para emitir NET's, en comparación a los individuos sanos (0.653 vs 0.168 respectivamente).

Discusión

La metodología de este proyecto comprendió un análisis integral de múltiples características fenotípicas y funcionales tanto de características hematológicas y funcionales de los neutrófilos y pDC de pacientes con LES en comparación a las mismas células de individuos sanos. El análisis de las historias clínicas de los pacientes permitió establecer que el muestreo fue adecuado coincidiendo con las características que reporta la bibliografía para los pacientes que presentan esta enfermedad (Proporción en género, 1:9 entre hombres y mujeres, mujeres en edad reproductiva y frecuencia de las enfermedades asociadas).^{4-6,9}

El análisis de los parámetros hematológicos, mostró, de forma similar a lo reportado por otros

autores, leucopenia y linfopenia absoluta en los pacientes con LES.¹⁰ Sin embargo, en nuestra población analizada, aunque existió una tendencia en los pacientes con LES a presentar anemia y neutropenia, estos datos no fueron estadísticamente significativos, difiriendo a lo reportado en estudios poblacionales. Estas diferencias podrían deberse a que para este estudio se eligieron pacientes controlados bajo tratamiento, o bien debido al tamaño de la muestra analizada, la incorporación del análisis de más pacientes y en diferentes estados de evolución de la enfermedad, podría coincidir en el futuro con lo reportado por otros autores.

El análisis morfológico, fenotípico y de viabilidad de las poblaciones celulares purificadas (neutrófilos, pDC y pseudohifas de *C. albicans*), tanto por tinciones como por citometría de flujo, permitió establecer que el análisis funcional de estas células fue adecuado. Durante el análisis de los datos de expresión de BDCA-2 como marcador exclusivo de pDC,^{11,12} se reporta por primera vez, la separación de individuos tanto sanos como con SLE en dos poblaciones con base a los porcentajes de pDC en sangre periférica. Porcentajes altos (>20%) y porcentajes bajos (<10%). En estudios no presentados en este informe por falta de espacio, se han encontrado diferencias fenotípicas y funcionales en estas poblaciones (datos no publicados).

Gracias a la definición de las pDC's con base a su expresión de BDCA-2 y el cálculo de sus valores absolutos en sangre periférica con respecto a los leucocitos totales y a que no se encontraron diferencias significativas en sus porcentajes entre individuos sanos y pacientes con LES, se obtuvieron valores de 0.0108 (± 0.0063) y de 0.0179 (± 0.015), respectivamente. El porcentaje correspondiente de pDC's en sangre periférica con respecto al valor de leucocitos no está bien establecido.¹² Este trabajo establece las bases para contar con esta información, sin embargo debido a que no se cuenta con valores de referencia para comparar, se requiere de un estudio poblacional amplio para poder establecerlo.

El análisis de la expresión de CD40 como marcador de activación en pDC, reveló que estas células

se encuentran más activadas en los pacientes con LES a pesar de su tratamiento con medicamentos inmunosupresores. Esto podría ser debido a que estos medicamentos generalmente están dirigidos a la inhibición de la activación de los linfocitos,^{13,14} pero no tienen efecto sobre pDC. Un estado de activación continuo de las pDC presentando antígenos propios a linfocitos T, podría disminuir el umbral de activación sobre estas células y permitir una exacerbación de la enfermedad. Por lo anterior, la implementación de estrategias que inhiban a estas células podría mejorar la eficacia de los tratamientos de los pacientes con LES.

Los resultados obtenidos indican que los neutrófilos de los pacientes con SLE son más propensos a formar NET's y con ello una mayor liberación de ADN en comparación a los individuos sanos. En los pacientes con SLE, al tener una mayor concentración de ADN liberado y ser captado por pDC más activadas, podrían estar contribuyendo a una mayor presentación de antígenos derivados del ADN propio, y la consecuente producción de anticuerpos anti-ADN.

Lo anterior, revela que los tratamientos inmunosupresores utilizados en los pacientes con LES, están enfocados exclusivamente a suprimir la respuesta inmune adaptativa inhibiendo la proliferación de los linfocitos T, impidiendo la destrucción celular mediada por estas células y deteniendo la producción de auto-anticuerpos. Sin embargo, los estímulos iniciales que rompieron con esta pérdida de tolerancia hacia antígenos propios (mayor liberación de ADN por los neutrófilos y pDC más activadas) aún siguen presentes. Por lo anterior, las contribuciones a la salud y las propuestas derivadas de este trabajo son: a) El control del estado de activación de las pDC podría ayudar a disminuir el estado de autoinmunidad en los pacientes con LES (los glucocorticoides inhibe la secreción de IFN- α en monocitos y macrófagos pero no en pDC, sin embargo, los antimaláricos son más efectivos inhibiendo la producción de IFN- α en pDC). b) En individuos con susceptibilidad genética para desarrollar LES, se propone monitorear el estado de activación de las pDC mediante la cuantificación de la concentración de interferón tipo 1 y evitar la producción de NET's con el uso de Inhibi-

dores de la NADPH oxidasa tales como Glutatión, Apocinina, YodonioDifenil, (ya existentes en el mercado) y alguno en investigación (GKT137831, ML171, VAS2870) y evitar la activación de las pDC con el uso de anti-BDCA-2. Estas propuestas podría contribuir a impedir el desarrollo de LES en individuos con predisposición genética o evitar la exacerbación de la enfermedad en personas que ya la padecen.

Conclusiones

- Los pacientes con LES mostraron leucopenia y linfopenia absoluta, pero sin anemia, ni diferencias en el valor absoluto de neutrófilos.
- Se lograron establecer las bases para establecer el valor de referencia de pDC en sangre periférica.
- Se estandarizaron las condiciones para el análisis por fluorescencia de trampas extracelulares con el colorante bromuro de etidio, obteniendo imágenes de mayor calidad que las reportadas en la bibliografía.
- Los neutrófilos de los pacientes con SLE mostraron mayor susceptibilidad para inducir trampas extracelulares y liberar mayor concentración de ADN.
- Las pDC's de los pacientes con LES presentaron un mayor estado de activación en comparación a los individuos sanos, analizada por la expresión de CD40.
- El estado de activación de los pacientes con LES mostró una mayor correlación estadística con la susceptibilidad de sus neutrófilos para producir NET's en comparación a los individuos sanos.
- Este trabajo reveló que los tratamientos inmunosupresores que reciben los pacientes con LES, inhibe efectivamente la proliferación de los linfocitos, pero no tiene efecto sobre la respuesta inmune innata (neutrófilos y pDC).

Financiamiento

El presente trabajo fue realizado con financiamiento interno de las instituciones participantes y el proyecto de incorporación como PTC. PRODEP-DSA/103.5/14/7500.



Referencias bibliográficas

1. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine*, 2013. 210, 1283–1299.
2. Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Hartl, D. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, 2015;11, 13-15.
3. Bosch X. Systemic Lupus Erythematosus and the Neutrophil. *N Engl J Med* 2011; 365:75-760.
4. Tan E. M., Schur P. H., Carr R. I., Kunkel H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 45, 1732–1740
5. Pathak, S., & Mohan, C. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis Research & Therapy*, 2011. 13(5), 241.
6. Graham K. L., Utz P. J. (2005). Sources of autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17, 513–517
7. Fei, T., Qiumei, D., & Yong-Jun, L. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Science China. Life Sciences*, 53(2), 172–182. 2010
8. Fransen, J. H., Vlag, J. van der, Ruben, J., Adema, G. J., Berden, J. H., & Hilbrands, L. B. (2010). The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 12, 207.1
9. BoriG, Principales enfermedades reumáticas en México. Aspectos epidemiológicos e impacto socioeconómico. *Rev MexReumat.* 2015; 15: 183-201.
10. Fei, T., Qiumei, D., & Yong-Jun, L. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Science China. Life Sciences*, 53(2), 172–182. 2010
11. Dzionek A. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 2001; 194:1823–1834.
12. Ban, Y.-L., Kong, B.-H., Qu, X., Yang, Q.-F., & Ma, Y.-Y. (2008). BDCA-1+, BDCA-2+ and BDCA-3+ dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Clinical and Experimental Immunology*, 151(3), 399–406.
13. Crispin J. C., Kytтары V. C., Terhorst C., Tsokos G. C. (2010). T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 317–325
14. Dorner T., Jacobi A. M., Lee J., Lipsky P. E. (2011). Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Methods* 363, 187–197.