

## Nº 71. FENOTIPO DE MONOCITOS CIRCULANTES Y ASOCIACIÓN CON RIESGO CARDIOVASCULAR EN AR

KARSULOVIC C\*, TEMPIO F, GUERRERO J, GOECKE A.

ICBM, Facultad Medicina. Depto Medicina, HCUCH. Sección Reumatología, HCUCH.

**Introducción:** En Artritis Reumatoide (AR), la principal causa de muerte es la enfermedad cardiovascular (ECV). El riesgo CV en AR no se explica del todo por factores clásicos de riesgo CV, ni aun considerando actividad inflamatoria. El fenotipo de los macrófagos (M $\phi$ ) en la placa de ateroma tiene un rol en su progresión y complicaciones. Los monocitos circulantes (M), precursores de los M $\phi$ , también han sido fenotipificados. El fenotipo M1 se relaciona con ateromatosis. mTORC, un complejo quinasa, y Autofagia, proceso catabólico intracelular, participan en la determinación del fenotipo de M $\phi$  y M y tienen modulación recíproca. No se sabe si mTORC y Autofagia se relacionan con fenotipo de M en AR y ECV.

**Objetivo:** Determinar la actividad de mTORC, Autofagia y relación M1/M2 de M en pacientes (pt) con AR con y sin ECV.

**Materiales y métodos:** Se estudió 9 pt con AR (criterios EULAR/ACR 2010) y ECV previos, 9 pt AR sin ECV pareados por demografía, características de AR, tratamiento y factores de riesgo de ECV y 6 sujetos sanos. La actividad de Autofagia (BECLIN1 y LC3II) se midió por ELISA. Se realizó fenotipificación de M, cuantificación de IL-1 $\beta$  e IL-6 intracelular y actividad

mTORC por citometría de flujo en M de sangre periférica. Para el análisis se utilizó ANOVA y las correlaciones con coeficiente de Pearson. Hubo aprobación por comité de ética y los participantes otorgaron consentimiento informado.

**Resultados:** Pt con AR y ECV tienen mayor frecuencia de M1 circulantes que pt sin ECV (78+-12% v/s 56,9+-14% p<0,01) La relación M1/M2 está elevada en pt con ECV respecto a sin ECV y controles sanos (18+-7% v/s 9,1+-4,2% v/s 7,18+-3,2 p<0,02, p<0,005 respectivamente). IL-1 $\beta$  e IL-6 intracelular están elevadas en pt con AR y ECV (26,1+-11 v/s 14+-4,6% p<0,001) e IL-1 $\beta$  se correlacionan con el fenotipo M1 (r=0,51, p<0,02). mTORC está elevado en AR respecto a sujetos sanos (2345+-324 v/s 1034+-245 p<0,001), y es mayor en AR con ECV. La autofagia está elevada en pt con AR especialmente en ECV (11+-5,2 v/s 2+-0,2 p<0,0001).

**Conclusiones:** Nuestro trabajo muestra por primera vez que pt con AR y ECV presentan mayor actividad de mTORC, Autofagia y aumento de frecuencia del fenotipo M1. Esto pudiera tener un rol en la patogenia de la ateromatosis de inicio temprano. De ser así, se pueden evaluar marcadores tempranos y estrategias más efectivas de prevención primaria de ECV en AR.

Financiamiento: OAIC, Hospital Clínico Universidad de Chile.

## Nº 72. TRANSFERENCIA DE ORGANELOS INTRACELULARES: UN NUEVO NIVEL DE REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

COURT AC1\*, LE-GATT A1, LUZ-CRAWFORD P1, PARRA-CRISÓSTOMO E1, ALIAGA V2, BÁTIZ LF1, MARACAJA-COUTINHO V2, PINO-LAGOS K1, KHOURY M1,a, FIGUEROA FE1,a

1 Centro de Investigación Biomédica. Universidad de los Andes, Santiago-Chile

2 Centro de Modelamiento Molecular, Biofísica y Bioinformática, Universidad de Chile, Santiago-Chile.

**Introducción:** La transferencia mitocondrial (MitoT) desde células mesenquimales del estroma (MSC) contribuye a la restauración del daño tisular inmune. Dado que la función efectora del sistema inmune depende de su metabolismo celular, propusimos que la MitoT representa un nuevo nivel de control de la respuesta inmunológica.

**Objetivos:** Evaluar el impacto de la MitoT de MSCs de cordón umbilical (UC-MSC) sobre la diferenciación de poblaciones linfocitarias in-vitro y su efecto en un modelo animal de injuria inmunológica.

**Materiales y métodos:** Se evaluó la MitoT de UC-MSC con marcaje de mitocondrias (MT) en co-cultivo con mononucleares de sangre humana (MSP), por citometría de flujo y microscopía confocal. La transferencia artificial de MT (MitoCeption) se evaluó post “sorting” celular, comparando linfocitos aceptores de MT (MitoTpos) vs no aceptores (MitoTneg) por microscopía electrónica, análisis metabólico “SeaHorse”, RNA-sequencing y qRT-PCR. Se evaluó la diferenciación y función de T reguladores (Treg) in-vitro y el rol de la MitoT en la evolución de un modelo murino de Injerto-contra-Huésped (ICH).

Financiamiento: FONDECYT 1170852

**Resultados:** La MitoT de UC-MSC a linfocitos humanos T y B (CD3+ o CD19+) ocurrió sólo a 37°C, en forma rápida (4-5 hr), dosis dependiente y preferente para células CD4+ vs CD8+ (61% vs 19%). Se confirmó por microscopía confocal y qPCR mediante la detección de un gen mitocondrial humano en las células MitoTpos de ratón, sorteadas post co-cultivo con UC-MSCs. La MitoCeption indujo un cambio metabólico en las células blanco MitoTpos y la transcripción de un “cluster” de mRNAs característico de Tregs, incluyendo FoxP3, IL2RA, Ctla4 y Tgf-β1. Comprobamos el efecto fisiológico de esta reprogramación celular al obtener un 20% de Tregs (CD4+ CD127 low CD25+ Foxp3+) a partir de Linfocitos naïve (CD4+ CD45RA+ CD45RO-) en respuesta a la MitoCeption, sin ningún estímulo adicional. Su actividad supresora se validó en ensayos de inhibición de la proliferación de MSPs. Finalmente demostramos que la inducción del modelo de ICH con MSP-MitoTpos se asocia a mejoría clínica, mayor supervivencia y a una reducción del daño e infiltración tisular inmune.

**Discusión:** Nuestros resultados revelan un nuevo mecanismo de reprogramación de Linfocitos CD4+ y apuntan a una posible terapia basada en organelos para el control de las enfermedades mediadas por el sistema inmune.

## Nº 73. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN NEUTRÓFILO/LINFOCITO EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

CÁCERES B\*1, FLORES D1, SAEZ K2, ORMAZABAL V3, CASTRO I4,5, NOVA-LAMPERTI E1 Y LAMPERTI L1

1Facultad de Farmacia. 2Facultad Ciencias Físicas y Matemáticas. 3Facultad Ciencias Biológicas. 4Facultad de Medicina. Universidad de Concepción. 5Hospital Guillermo Grant Benavente Concepción.

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, de etiología aún desconocida y de carácter autoinmune caracterizada por inflamación crónica en la membrana sinovial de las articulaciones con movimiento libre y cavidad articular. En la actualidad, esta patología tiene un diagnóstico inicial confirmatorio realizado con la clínica del paciente, acompañado de exámenes de laboratorio de tipo inmunológicos y hematológicos. En los pacientes AR es necesario determinar la actividad de la enfermedad con el índice DAS28, que permite evaluar la eficacia de la terapia farmacológica administrada. El seguimiento de la evolución de la actividad de la enfermedad es fundamental para evitar discapacidad a mediano y largo plazo, ya que la injuria en la articulación es de carácter irreversible y de mal pronóstico si el cuadro inflamatorio no es controlado. El aumento de la relación neutrófilo/linfocito (NLR) se ha descrito como

un parámetro de inflamación asociado a un aumento de la respuesta innata, con predominio de neutrófilos y disminución de los linfocitos. Esta relación NLR ha demostrado ser un buen predictor de inflamación en enfermedades crónicas como diabetes y cáncer y se ha observado gran variabilidad entre etnias.

**Objetivo:** Caracterizar la relación NLR, en una muestra de pacientes con AR.

**Métodos:** Se reclutaron 11 pacientes AR y 11 controles de edades similares y mismo sexo que firmaron consentimiento informado aprobado por Comité Ético Científico. En una muestra de sangre se realizó hemograma en equipo Sysmex XS-1000i. Se dividió los valores absolutos de neutrófilos por linfocitos. Se analizaron los valores de DAS28 y VHS. Se usaron pruebas estadísticas para variables continuas.

**Resultados:** La NLR fue mayor en pacientes AR con un va-

lor  $2,72 \pm 0,68$  versus controles con  $1,56 \pm 0,34$   $p < 0,0001$ . Para la clasificación de la actividad de la enfermedad según DAS28, la NLR fue de  $3,69 \pm 0,25$  para actividad alta,  $2,49 \pm 0,29$  para moderada y  $2,23 \pm 0,32$  para baja y el coeficiente de correlación de VHS-NLR fue de 0,34 y la DAS28-NLR de 0,815.

**Conclusión:** La NLR fue mayor en pacientes AR que en el grupo control. Se demuestra que NLR se correlaciona de forma positiva con el DAS28 y la VHS. Además, la NLR fue mayor para pacientes con actividad de la enfermedad alta, comparado con la moderada y baja.

## Nº 74. ROL CONTROVERSIAL DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNA P RIBOSOMAL EN NEFRITIS LÚPICA Y EN REACCIÓN CRUZADA CON DSDNA

BRAVO-ZEHNDER M, MIMICA M, BURGOS PI, GAJARDO-MENESES P, MONTALVA R, GONZÁLEZ A Y MASSARDO L.

Centro de Biología Celular y Biomedicina (CEBICEM), Universidad San Sebastián.  
Departamento de Inmunología Clínica y Reumatología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

**Introducción:** Los anticuerpos anti-proteína P ribosomal (anti-P) tienen un papel patogénico en manifestaciones del sistema nervioso central en lupus eritematoso sistémico (LES). Dos controversias aún permanecen con los anti-P: la posible asociación con nefritis lúpica (NL) y una eventual reacción cruzada con anti-dsDNA, puesto que sus niveles fluctúan juntos en relación con la actividad del LES. Ambas propuestas son apoyadas o refutadas por distintos estudios.

**Objetivos:** 1) Investigar la asociación de anti-P con las clases histológicas de NL III, IV y V. 2) Determinar si poseen reacción cruzada con dsDNA.

**Métodos:** Estudio de diseño transversal. 1) En 26 pacientes con NL comprobada mediante biopsia (ISN/RPS) se analizó la presencia concomitante de anti-dsDNA y anti-P. 2) En sueros de otros 24 pacientes con LES se determinó si había reacción

cruzada de anti-P purificado por afinidad con dsDNA, y si los anti-dsDNA reaccionaban con la fosfoproteína P0 completa o su epítipo. Para ambos objetivos se usó inmunoblot y ELISA.

**Resultados:** 1) Diecisiete pacientes (65%) presentaron NL clase III / IV y 9 (35%) NL Clase V; 24 (92%) tenía anti-dsDNA y 4 (15%) anticuerpos anti-P. La positividad de anti-P no presentó diferencia significativa entre las clases de LN. 2) Se obtuvieron anticuerpos anti-P purificados por afinidad a partir de 6 sueros anti-P (+) [4 de ellos con anti-dsDNA (+)] y no hubo reacción cruzada con dsDNA. Los mismos sueros, una vez extraídos los anti-P pero manteniendo la actividad anti-dsDNA, perdieron completamente capacidad de reconocer el epítipo P0 (ver tabla). Además, 16 sueros anti-dsDNA (+) / anti-P (-) no reconocieron el epítipo P0.

**Conclusiones:** Los resultados del presente estudio no respaldan un rol significativo de anti-P en NL, y descartamos que exista reactividad cruzada entre anti-P y anti-dsDNA.

Financiamiento: FONDECYT # 1160513 a LM

Reacción cruzada entre anticuerpos anti-P y anti-dsDNA obtenidos de seis pacientes con LES anti-P (+).				
Pacientes	Muestras	ELISA		Inmunoblot P0 <sup>WT</sup>
		anti-P (U/ml)	anti-dsDNA (UI/ml)	
N1	Suero anti-P(+)/anti-dsDNA ID <sup>a</sup>	141.0	34.0	+
	<i>Anti-P- extraído</i>	18.5	18.4	-
	<i>Anti-P-purificado por afinidad</i>	66.8	1.6	+
N2	Suero anti-P(+)/anti-dsDNA ID <sup>a</sup>	109.0	56.9	+
	<i>Anti-P- extraído</i>	6.9	18.5	-
	<i>Anti-P-purificado por afinidad</i>	45.2	1.5	+

N3	Suero anti-P(+)/anti-dsDNA(+)	43.5	436.1	+
	<i>Anti-P- extraído</i>	3.0	476.9	-
	<i>Anti-P-purificado por afinidad</i>	57.2	2.8	+
N4	IgG anti-P(+)/anti-dsDNA(+)	123.0	642.8	+
	<i>Anti-P- extraído</i>	4.2	469.4	-
	<i>Anti-P-purificado por afinidad</i>	70.0	6.0	+
N5	IgG anti-P(+)/anti-dsDNA(+)	154.0	856.0	+
	<i>Anti-P- extraído</i>	22.8	494.0	-
	<i>Anti-P-purificado por afinidad</i>	71.0	6.5	+
N6	IgG anti-P(+)/anti-dsDNA(+)	134.0	360.9	+
	<i>Anti-P- extraído</i>	10.4	128.4	-
	<i>Anti-P-purificado por afinidad</i>	78.8	6.0	+
<sup>a</sup> ID: niveles indeterminados de anti-dsDNA correspondiente a títulos 30-75 UI/ml; estos pacientes fueron negativos por <i>Crithidia luciliae</i>				

## Nº 75. PÉPTIDOS RECONOCIDOS POR CÉLULAS T CD4+ DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE ESENCIALES PARA UNA TERAPIA TOLERIZANTE CON CÉLULAS DENDRÍTICAS

SOTO L1,2, NEIRA O3, CUELLAR MC3, MAGGI J1, ARAVENA O1, SCHINNERLING K1, MENARES E, CARRASCAL M4, JARAQUEMADA D5, CATALÁN D1, AGUILLÓN JC1

1Programa de Inmunología, Universidad de Chile. 2HCUCH. 3Hospital del Salvador.

4Proteomics Laboratory, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). 5Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, España.

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, iniciada y perpetuada por las células T CD4+ (TCD4+) que reconocen autoantígenos presentados por las células dendríticas (DCs). Aunque se ha propuesto a varios péptidos como autoantígenos de células T, responsables de gatillar el proceso autoinmune, se requiere expandir la investigación en esta área, en especial porque los resultados obtenidos serán vitales para el diseño de terapias basadas en DCs, presentadoras de estos autoantígenos en un contexto tolerizante.

**Objetivo:** Identificar péptidos inmunodominantes (PIDs) de TCD4+, derivados desde proteínas sinoviales de pacientes con AR, útiles para ser presentados por DCs tolerogénicas (Tol-DCs) con el fin de restablecer la autotolerancia inmune.

**Material Y Métodos:** Se aislaron y secuenciaron por espectrometría de masas, péptidos unidos a moléculas MHC clase II, ya sea de DCs cargadas con fluido sinovial o DCs residentes en tejido sinovial, de pacientes con AR, o usando un sistema artificial de procesamiento. Con los péptidos selectos sinteti-

zados se estimuló células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AR y donantes sanos. La reactividad de las TCD4+ se evaluó por la expresión de marcadores de activación y citoquinas pro-inflamatorias por citometría de flujo (CF). Se co-cultivó TolDCs ó DCs maduras de pacientes con AR, cargadas con los PIDs de interés, con TCD4+ autólogas, evaluando proliferación y citoquinas por CF.

**Resultados:** Se seleccionó e identificó 12 péptidos, de los cuales seis (derivados de calreticulina, vimentina, fibronectina y fibrinógeno) desplegaron una gran capacidad inmunoes-timuladora en las TCD4+ de pacientes con AR, demostrando además ser específicos para la enfermedad, dada la ausencia de reactividad con las TCD4+ de donantes sanos. La presentación de PIDs por las TolDCs redujo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias por los TCD4+ autoreactivos de pacientes con AR comparado a la expresión inducida por las DCs maduras.

**Conclusiones:** Hemos identificado seis péptidos autoanti-génicos de TCD4+ que pueden ser relevantes para el inicio de la AR, y cuya respuesta inflamatoria puede ser disminuida por las TolDCs, lo cual alienta su aplicación como una terapia tole-rizante antígeno-específica.

Financiamiento: FONDEF ID15I20080, ID18I10243 y FONDECYT 1181853.

## Nº 76. DISTRIBUCIÓN DE ALELOS HLA-DRB1 ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN PACIENTES CHILENOS CON ARTRITIS REUMATOIDE

NEIRA O\*, MAGGI J#, SOTO L#,&, CUELLAR MC\*, ARAVENA O#, LEIVA P#, RAMOS V#, RIVAS E#, SCHINNERLING K#, PALOU E4\*\*, CATALÁN D#, AGUILLÓN JC#.

#Programa de Inmunología, Facultad de Medicina, & Hospital Clínico. Universidad de Chile.

\*Sección de Reumatología, Hospital del Salvador. \*\*Servicio de Inmunología, Hospital Clínic de Barcelona, España.

**Introducción:** La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, crónica e invalidante, iniciada y perpetuada por linfocitos T CD4+ que reconocen autoantígenos expuestos en moléculas HLA de células presentadoras de antígeno. Se ha asociado la presencia de ciertos alelos del gen HLA-DRB1, que codifican una secuencia de aminoácidos conocida como el "epitopo compartido" (EC), de alta afinidad por péptidos artritogénicos, con el riesgo de desarrollar AR y una expresión clínica más severa de la misma.

**Objetivo:** Estudiar la distribución de alelos HLA-DRB1 que expresan el EC en pacientes con AR y en controles sanos chilenos, información relevante para el diseño de estrategias terapéuticas innovadoras como aquéllas basadas en células dendríticas inductoras de tolerancia antígeno-específica.

**Métodos:** A partir de muestras de sangre periférica de 120 pacientes con AR y 212 controles sanos, reclutados desde la Región Metropolitana, se realizó la purificación de DNA, usando el método salting out. Posteriormente, se llevó a cabo el tamizaje de individuos positivos para los haplotipos DR1, DR4

y DR14 por PCR convencional, seguido de PCR-SSO, para la determinación de variantes alélicas específicas. Se consideraron positivos para el EC, aquellos donantes que presentaran alguno de los siguientes alelos: HLA-DRB1\*0101, \*0401, \*0404, \*0405 ó \*1402.

**Resultados:** El 51.7% de los pacientes con AR y el 20.8% de los controles presentaron al menos un alelo que codifica para el EC ( $p=0.0001$ ). A su vez, los alelos \*1402 y \*0405 mostraron una alta asociación a AR, con porcentajes del 18.3% versus 6.1%, ( $p=0.0009$ ) y 10.8% versus 1.4% ( $p=0.001$ ) del total de pacientes y controles, respectivamente. Un hallazgo interesante, fue que dentro de los alelos del EC, el más frecuente en pacientes con AR resultó ser el \*1402 (32,8% de los pacientes EC+).

**Conclusiones:** Se evidencian un alto porcentaje de pacientes chilenos con AR que expresan el EC, en comparación a controles sanos, observándose una alta frecuencia del alelo \*1402 en pacientes, alelo previamente relacionado con AR en pueblos nativos de América de Norte. Se provee información actualizada de la prevalencia de alelos de riesgo en AR en Chile, lo que puede contribuir a un mejor diseño de aplicaciones terapéuticas pertinente al perfil genético nacional.

Financiamiento: FONDEF ID15120080, ID18110243 y FONDECYT 1181853.