



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DISTRIBUCIÓN Y FENOTIPO DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS B Y CÉLULAS
NK EN EL DAÑO PULMONAR AGUDO (ALI) EN UN MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARTÍNEZ ESPINOSA ISRAEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS.

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZUÑIGA RAMOS

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS.

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DISTRIBUCIÓN Y FENOTIPO DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS B Y CÉLULAS
NK EN EL DAÑO PULMONAR AGUDO (ALI) EN UN MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARTÍNEZ ESPINOSA ISRAEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS.

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZUÑIGA RAMOS

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSIO VILLEGAS.

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/686/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de abril de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **MARTÍNEZ ESPINOSA ISRAEL** con número de cuenta **305117003** con la tesis titulada **“DISTRIBUCIÓN Y FENOTIPO DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITO B Y CÉLULAS NK EN EL DAÑO PULMONAR AGUDO (ALI) EN UN MODELO MURINO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. LUIS ARMANDO JIMÉNEZ ALVAREZ
Vocal: DRA. IRIS KARINA MADERA SALCEDO
Vocal: DRA. EDA PATRICIA TENORIO ZUMÁRRAGA
Vocal: DR. ARNOLDO AQUINO GÁLVEZ
Secretario: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Esta tesis fue financiada por el proyecto de CONACyT No. 223414 y por la beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT.

Finalmente, agradezco el apoyo brindado por la Dra. Blanca Ortiz Quintero como tutor principal y por la colaboración del Dr. Joaquín A. Zuñiga Ramos y Dr. Federico Ávila Moreno al formar parte del Comité Tutorial.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por permitirme concluir con esta etapa de mi formación profesional. A pesar de los contratiempos que surgieron durante este proyecto, su gracia siempre dispuso a las personas indicadas que me apoyaron.

Gracias a Rebeca mi esposa, por su amor y dedicación incondicional a la elaboración de este trabajo y por haber dado el mayor ejemplo de esfuerzo. Tú, mejor que nadie conoce el esfuerzo que fue necesario y sin ti no lo hubiera logrado. Gracias por Lea. Porque la base de nuestra familia es tu apoyo diario. Gracias por las palabras de aliento y las tazas de café.

Gracias a mis padres, porque en cada etapa de mi vida sigo aprendiendo cosas maravillosas de ellos. El ejemplo y la persistencia que han demostrado en estos años me han hecho darle un nuevo significado a la palabra persistencia.

Es importante mencionar que sin el apoyo de la Dra. Blanca Ortiz Quintero este proyecto hubiera naufragado. Gracias por tu dirección objetiva, experiencia y apoyo en llevar a término este proyecto. Sobre todo, por tu amistad y sinceridad.

Gracias especialmente a la Dra. Eda Patricia Tenorio por su asesoría técnica, comentarios, consejos y sugerencias de los experimentos de citometría de flujo.

Quiero agradecer especialmente a las siguientes personas por su apoyo y amistad: Sandra Ramírez, Christian Alonso, Masiel Vásquez, Berenice Balderas, Dalia Barrera, Lalita Cerón, Dra. Patricia Gorocica, Dra. Selma Rivas, Dra. Blanca Espinosa, Rosa Nieto, Dr. Antonio Serratos, Dr. Roberto Lara, Dr. Francisco Urrea, Q. Damaris Rodríguez, Dr. Sullivan López, Dr. Noé Rodríguez, Dra. Iris Madera, Dr. Arnoldo Aquino y Dr. Luis Jiménez.

Gracias por la oportunidad Paco, sí se pudo.

Para Lea, luz de mi vida.

Para Rebeca, por ser piedra angular de este esfuerzo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Etiología del ARDS.....	6
1.2 Linfocitos B (LB)	9
1.2.1 Linfocitos B-2.	10
1.2.2 Linfocitos B-1.	13
1.3. Células asesinas naturales (NK).	15
1.4 Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS).	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos particulares	23
5. METODOLOGÍA	24
6. RESULTADOS	32
6.1. Validación del modelo de daño pulmonar agudo.	32
6.2. Distribución y fenotipo de subpoblaciones de linfocitos B	37
6.3. Distribución y fenotipo de subpoblaciones de células NK	54
7. DISCUSIÓN	65
8. CONCLUSIONES	70
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de casos de ARDS por factores de riesgo específicos entre 2006 y 2014 en EE. UU.	6
Figura 2. Desarrollo del daño pulmonar agudo (ALI).....	8
Figura 3. Estructura de un anticuerpo o inmunoglobulina.....	9
Figura 4. Estadios de maduración de los linfocitos B2 murinos en la médula ósea.....	11
Figura 5. Estadios de maduración de las células NK murinas en la médula ósea.	16
Figura 7. Administración intranasal en ratones sedados.	24
Figura 8. Procedimiento para realizar el lavado broncoalveolar.....	25
Figura 9. Preparación del gradiente de Percol al 40% y 70% para separación de leucocitos	27
Figura 10. Aumento de la concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar.....	32
Figura 11. Aumento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar en modelo de ALI.	33
Figura 12. Infiltrado de neutrófilos y daño en tejido pulmonar en modelo de ALI.....	34
Figura 13. Estrategia de análisis por citometría de flujo de neutrófilos en tejido pulmonar.	35
Figura 14. Infiltrado de neutrófilos en tejido pulmonar en el modelo de ALI mediante citometría de flujo.....	35
Figura 15. Análisis cuantitativo del infiltrado de neutrófilos en pulmón con ALI.	36
Figura 16. Estrategia de análisis para datos de citometría de flujo para identificar linfocitos B y subpoblaciones B2, B1-a y B1-b.	37
Figura 17. Disminución del porcentaje de linfocitos B totales en pulmón con ALI.	38
Figura 18. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en pulmón con ALI.	39
Figura 19. Expresión de los marcadores CD11b y CD19 y porcentaje de células CD69 ⁺ en las subpoblaciones de linfocitos B en pulmón con ALI.	40
Figura 20. Porcentaje de linfocitos B en cavidad pleural de ratones con ALI.....	42
Figura 21. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en cavidad pleural en ratones con ALI.....	43
Figura 22. Expresión de los marcadores CD11b y CD19 y porcentaje de células CD69 ⁺ en las subpoblaciones de linfocitos B en cavidad pleural de ratones con ALI.....	44
Figura 23. Porcentaje de linfocitos B en cavidad peritoneal de ratones con ALI.	46
Figura 24. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en cavidad peritoneal de ratones con ALI.	47
Figura 25. Expresión de los marcadores CD11b y CD19 y porcentaje de células CD69 ⁺ en las subpoblaciones de linfocitos B en cavidad peritoneal de ratones con ALI.	48
Figura 26. Porcentaje de linfocitos B en bazo de ratones con ALI.....	49
Figura 27. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en bazo de ratones con ALI.	50
Figura 28. Expresión de los marcadores CD11b y CD19 y porcentaje de células CD69 ⁺ en las	

subpoblaciones de linfocitos B en bazo de ratones con ALI.	51
Figura 29. Fenotipo de las subpoblaciones B2, B1-b CD11b ^{mid} y B1-b CD11b ^{Hi} en los órganos estudiados en el modelo de ALI.	53
Figura 30. Estrategia para de análisis por citometría de flujo para identificación de células NK y sus estadios de maduración.....	54
Figura 31. Disminución del porcentaje de células NK totales en pulmón con ALI.	55
Figura 32. Distribución de estadios de maduración de células NK en pulmón con ALI.	56
Figura 33. Porcentaje de células NK en cavidad pleural con ALI.	57
Figura 34. Distribución de estadios de maduración de células NK en cavidad pleural con ALI.	58
Figura 35. Porcentaje de células NK en cavidad peritoneal con ALI.....	59
Figura 36. Distribución de estadios de maduración de células NK en cavidad peritoneal con ALI. 60	
Figura 37. Porcentaje de células NK en bazo con ALI.	61
Figura 38. Distribución de estadios de maduración de células NK en bazo con ALI.	62
Figura 39. Comparación de la distribución de estadios de maduración de células NK en los órganos estudiados en el modelo de ALI.	63
Figura 40. Expresión de CD69 en células NK aislados de pulmón en diferentes sitios anatómicos.	64
Figura 41. Evidencias observadas sobre las poblaciones de linfocitos B y células NK en el modelo de ALI y perspectivas del proyecto.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Epidemiología del ARDS en los últimos 20 años.	4
Tabla 2. Marcadores de superficie que expresan las principales subpoblaciones de linfocitos B murinos y humanos.	14
Tabla 3. Principales diferencias relacionadas con la anatomía pulmonar y el sistema inmunológico entre el ratón y el humano.	18
Tabla 4. Panel para identificación de neutrófilos en tejido pulmonar.	30
Tabla 5. Panel para la inmunofenotipificación de linfocitos B.	30
Tabla 6. Panel para identificación de estadios de maduración de células NK.	30
Tabla 7. Configuración óptica del citómetro BD FACS Aria II TM utilizado para la adquisición.	31

ABREVIATURAS

ALI. Daño pulmonar agudo.

ARDS. Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda.

Células NK. Células asesinas naturales.

CLP. Ligadura y punción cecal.

EE. UU. Estados Unidos

gMFI. Intensidad media geométrica de fluorescencia.

GM-CSF. Factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas.

IFN- γ . Interferon γ (gamma).

IgA. Inmunoglobulina A.

IgD. Inmunoglobulina D.

IgE. Inmunoglobulina E.

IgG. Inmunoglobulina G.

IgM. Inmunoglobulina M.

IL-1 β . Interleucina 1 β (beta).

IL-6. Interleucina 6.

IL-8. Interleucina 8.

KDa. Kilo Daltones

LB IRA. Linfocitos B activadores de la respuesta innata.

LB. Linfocitos B.

LPS. Lipopolisacárido.

MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad.

PMN. Leucocitos polimorfonucleares.

TNF α . Factor de Necrosis Tumoral α .

UCI. Unidad de Cuidados Intensivos.

UFC. Unidades formadoras de colonias.

USD. Dólares estadounidenses.

μ g. microgramos.

RESUMEN

El síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) está asociada a infecciones respiratorias o sepsis. Su patogénesis es multifactorial y compleja, pero se conoce que involucra una reacción inflamatoria sistémica no controlada, lo que puede conducir al daño pulmonar agudo (ALI) y con una mortalidad elevada. El ARDS es una de las principales complicaciones atendidas en las unidades de cuidados intensivos, por lo que es relevante elucidar los mecanismos inmunológicos involucrados.

Existen evidencias que sugieren un papel relevante de los linfocitos B y células asesinas naturales (NK) como componentes de la respuesta inmunológica que participan en el ARDS, pero todavía se desconoce su distribución y función particularmente en el microambiente pulmonar y en el desarrollo del ALI.

En este estudio se exploró la distribución y el fenotipo de subpoblaciones de linfocitos B y de los estadios de maduración de células NK en el microambiente pulmonar en condiciones normales (animales sanos) y durante el desarrollo del ALI inducido por la administración intranasal de lipopolisacárido (LPS) en un modelo con ratones C57BL/6. Dichas poblaciones celulares también fueron analizadas en la cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo, como microambientes de comparación.

El análisis de los linfocitos B en pulmón indicó que el porcentaje de estos disminuyó durante el desarrollo del ALI. A pesar de que la subpoblación B2 de linfocitos B fue la predominante en el pulmón, la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} aumentó su porcentaje y la expresión del marcador de activación CD69 durante el desarrollo de ALI. Además, se pudieron observar diferencias órganos específicas en la distribución y expresión de los marcadores CD19 y CD11b en las subpoblaciones de linfocitos B.

Por otro lado, en los ratones control se observó un porcentaje mayor de células NK totales residentes en el tejido pulmonar comparado con los otros órganos. El fenotipo predominante de células NK en el pulmón fueron las células NK maduras CD27^{low}, mientras que el fenotipo predominante en cavidad pleural, peritoneal y bazo fue el de células NK DP (CD11⁺CD27⁺), indicando una distribución órgano-específica de los estadios. Una diferencia notable fue que el porcentaje de células NK DP productoras de citocinas en el pulmón de ratones normales (3.9%), aumentaron durante el desarrollo del ALI (9.3%).

En trabajos posteriores será necesario determinar la expresión de moléculas y citocinas asociadas a la funcionalidad de dichas subpoblaciones celulares.

ABSTRACT

The Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is associated with respiratory infections and sepsis. The pathogenesis is complex and multifactorial; however, it's known that dysregulated systemic inflammatory response it's involved, this could produce acute lung injury (ALI) with a high mortality rate. ARDS is one of the main complications at intensive care units, therefore it's important to elucidate the involved immunologic mechanisms.

There are evidences that suggest a relevant role of B cells and NK cells as important components of immunologic response that participate in ARDS, but the distribution and function of these cells in the lung microenvironment and ALI it's not known.

In this study the distribution and phenotype of B cell subpopulations and NK cells maturation stages in the lung microenvironment were explored in normal conditions and during ALI development induced by intranasal administration of lipopolysaccharide (LPS) using a C57BL/6 mice model. These cellular populations were also analyzed in pleural cavity, peritoneal cavity and spleen as reference microenvironments.

B cells analysis in lung tissue showed that cell percentage decreased during ALI development. Despite the B2 B cell subpopulation was predominant in lung, the B1-b CD11b^{Hi} subpopulation increased its percentage and the expression of the activation marker CD69 during the ALI. Furthermore, organ-specific distribution and CD19 and CD11b expression in B cells subpopulations were observed.

Moreover, it was observed a mayor percentage of resident NK cells in lung compared with pleural cavity, peritoneal cavity and spleen in healthy mice. The predominant maturation stage of NK cells in lung was mature CD27^{low} NK cells, while the predominant stage in pleural cavity, peritoneal cavity and spleen was the double positive NK cells (CD11b⁺ CD27⁺, DP), showing an organ specific stage distribution. A notable difference was the increase of cytokine producing DP NK cells from healthy mouse (3.9%) during ALI development (9.3%).

In further works it will be mandatory to determine the expression of molecules and cytokines associated to these cell subpopulations functions.

1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS) se describe como una lesión inflamatoria pulmonar aguda y difusa que ocasiona un incremento de la permeabilidad vascular del pulmón y disminución del intercambio gaseoso ¹. Las características clínicas son: hipoxemia, taquipnea, disminución del coeficiente ventilatorio $PaO_2/FiO_2 \leq 300$, observación de opacidades difusas radiográficas e incremento del espacio muerto ^{2,3}. Por el momento, el tratamiento del ARDS es únicamente de soporte de la función respiratoria mediante ventilación mecánica y la administración de corticosteroides ⁴.

Diversos estudios epidemiológicos sobre el ARDS han sido realizados durante los últimos años. Estos trabajos reportan incidencias desde 1.3 hasta 220.1 casos por cada 100, 000 personas por año (**Tabla 1**). Esta variación puede estar relacionada con la infraestructura hospitalaria de los países en los que se llevaron a cabo los estudios y los criterios diagnósticos utilizados en cada estudio. A pesar de que el ARDS puede presentarse a cualquier edad, los estudios referidos coinciden en que se desarrolla principalmente en individuos de 40 años en adelante, como consecuencia de neumonía, sepsis o bronco aspiración (**Figura 1**). La mortalidad asociada es de entre 40% y 50%, incrementando con la edad. De acuerdo a Eworuke y cols., entre 2006 y 2014, identificaron 1, 151, 969 casos de ARDS en EE. UU., aprox. 130, 000 casos cada año ⁵. Hasta ahora no se han publicado trabajos sobre la epidemiología del ARDS en México.

En el estudio de Bellani y cols., realizado a partir de un grupo de 29,144 pacientes de unidades de cuidados intensivos (UCI) de 50 países diferentes, se observó que el 10.4% de los pacientes admitidos tenían un diagnóstico verificado de ARDS ⁶. Los principales factores de riesgo reportados fueron: neumonía (59.4%), sepsis de origen extra-pulmonar (16.0%) y aspiración de contenido gástrico (14.2%); mientras que las enfermedades crónicas asociadas fueron: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, 21.7%), diabetes (21.7%) y algún tipo de inmunocompromiso (12.1%). El 78.6% de los pacientes requirió de ventilación mecánica a partir de las 48 h de ingreso y hasta por 18 días. Estos datos concuerdan con lo reportado en otras publicaciones ⁷⁻¹⁰.

Tabla 1. Epidemiología del ARDS en los últimos 20 años.

Año	Lugar de estudio	Periodo de estudio (duración ^a)	# de pacientes	Incidencia ^b	Factores de Riesgo	Mortalidad	Otros	Referencia
2002	EE. UU.	1996-1999 (38m)	902	-	Neumonía Sepsis Broncoaspiración	38%-52%	Principalmente en pacientes >70 años.	11
2003	EE. UU.	1996-1999 (36m)	7,455	1.3 – 22	-	40%	-	12
2003	Revisión sistemática	1983-1999	-	17.0 – 88.6	-	40%	Incluye datos de EE. UU., España, Suecia, Dinamarca, Islandia, Australia.	13
2004	Europa	1999 (2)	463	-	Edad < 55 Neumonía Broncoaspiración Sepsis	45.8%- 54.7%	Incluye datos de Bélgica, Francia, Alemania, Grecia, Islandia, Italia, Portugal, España, Suiza y Reino Unido.	14
2005	EE. UU.	1999-2000 (5)	1,113	78.9	Sepsis Edad Traumatismos	41.2%	Mortalidad < 24% en adultos jóvenes vs. mortalidad > 60% en adultos > 80 años.	8
2006	EE. UU.	2000-2003 (36)	216	-	-	27.8%	ARDS causado por traumatismos. Edad: 42 años Hombre: 78.2%	15
2008	EE. UU.	1999-2000 (15)	1,113	-	Sepsis no pulmonar Sepsis de origen pulmonar Traumatismo	39%	Los marcadores predictivos de mortalidad del ARDS son similares a aquellos de los pacientes de la UCI.	16
2009	EE. UU.	1999-2000 (14)	39	12.8	Sepsis Neumonías (excluyendo las causadas por VRS) Traumatismo.	18%	Pediátricos (5 a 15 años).	17
2010	Revisión	-	-	16.0 – 86.2	Infecciones pulmonares Broncoaspiración Sepsis Traumatismo	29%-42%	-	2

Continúa en la siguiente página

Año	Lugar de estudio	Periodo de estudio (duración ^a)	# de pacientes	Incidencia ^b	Factores de Riesgo	Mortalidad	Otros	Referencia.
2011	EE. UU.	1999-2008	917	2.02	Sepsis Neumonía Choque ALI recurrente asociado a ERGE.	47%	Edad: 69 años Mujeres: 57.9%	18
2016	Internacional	2014 (5m)	3,022	0.42 casos/cama de UCI ^c	Neumonía Sepsis Broncoaspiración	34.8%	Incluye datos de 50 países: África (3), Asia (10), Europa (23), América (12), Oceanía (2). Edad: 61.5 años Mujeres: 38%	6
2016	Internacional	2014-2015 (12)	3,023	-	Neumonía Falla Renal Infecciones	29.0-32.0%	Incluye datos de 16 países. Edad: 65 años Hombres: 37%	19
2017	Estudio retrospectivo con los datos del ARDS Network	1996-2008	2,914	-	Sepsis Neumonía Broncoaspiración	28.6%	ARDS causado por sepsis tiene una mortalidad mayor que la causada por neumonía, broncoaspiración y traumatismos. Edad > 50 años	7
2018	Internacional	2014 (4 s)	2,377	-	Neumonía Falla cardíaca	23.4%	Incluye datos de 50 países. Mortalidad de pacientes traqueostomizados: 23.4% vs. no-traqueostomizados: 38.1% Edad: 63 años Hombres: 64%	20
2018	EE. UU.	2006-2014	1,151, 969	180.7-220.1	Neumonía Sepsis	40.7%- 50.6%	Edad: 62 años Mujeres: 45.6 %	5

a. m. meses; s. semanas.

b. #casos por cada 100, 000 pacientes por año.

c. reportada como número de casos por cama de UCI.

ERGE. Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico. UCI. Unidad de Cuidados Intensivos. VRS. Virus Respiratorio Sincial.

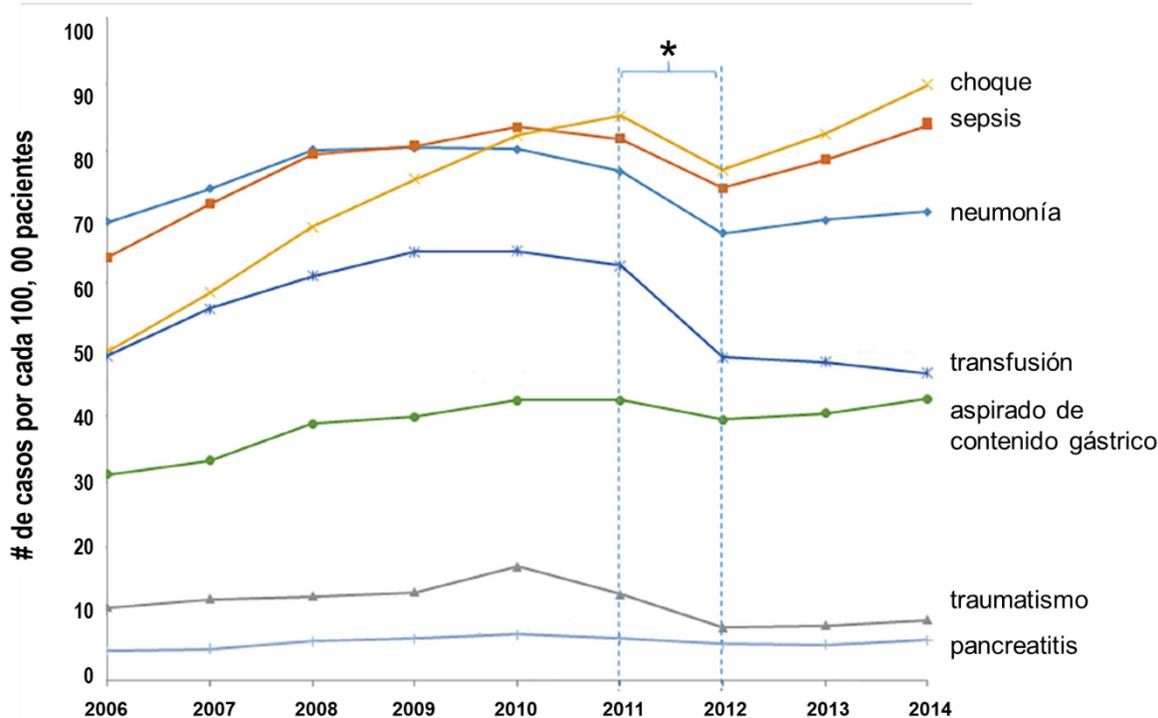


Figura 1. Incidencia de casos de ARDS por factores de riesgo específicos entre 2006 y 2014 en EE. UU.
 El intervalo marcado con * corresponde a la actualización en la definición de ARDS realizada por el ARDS Definition Task Force en 2012. Figura modificada de Eworuke, 2018 ^{3,5}.

El ARDS es una de las principales complicaciones atendidas en la UCI y representa un gasto de \$10,000 a \$14,000 USD por paciente. Estas cifras pueden cuadruplicarse dependiendo de la severidad del síndrome y las comorbilidades del paciente ^{21,22}.

1.1. Etiología del ARDS

El ARDS es consecuencia de una reacción inflamatoria desmedida del individuo, ocasionada por diversos estímulos dañinos en el tejido pulmonar, de otro sitio anatómico o sistémico. Estos estímulos ocasionan que patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) y/o patrones moleculares asociados a daño (DAMP's) liberados por las células de los tejidos dañados sean reconocidos por receptores presentes en los macrófagos (PRR). Este reconocimiento lleva a la producción de citocinas como TNF α , IL-1b e IL-6. El TNF α y la IL-1 β activan a las células endoteliales, atrayendo al tejido dañado a leucocitos neutrófilos de la circulación; también ocasionan fiebre y otros síntomas sistémicos. La IL-6 estimula la producción en el hígado de proteínas de fase aguda y estimula la producción de neutrófilos en la médula ósea. Además, los macrófagos y las células del tejido dañado liberan IL-8 y MCP-1, citocinas que potencian la atracción de más neutrófilos y otros leucocitos ^{23,24}.

Dado que la reacción inflamatoria es desmedida, la elevada concentración de citocinas en la circulación permite que estas alcancen el tejido pulmonar y ocasionen un aumento de la permeabilidad en los capilares alveolares, permitiendo la entrada de suero al intersticio alveolar y aumentando la expresión de proteínas de adhesión del endotelio. Este fenómeno también aumenta la concentración de citocinas en el intersticio y espacio alveolar. Posteriormente, se presenta una migración e infiltrado excesivo de neutrófilos, que altera la permeabilidad de la membrana alveolo capilar.^{24,25} Ya que los neutrófilos alcanzan el interior del alveolo se degranulan y liberan mieloperoxidasa, metaloproteinasas 8 y 9, elastasa, y especies reactivas de oxígeno que dañan el espacio alveolar^{26,27}. También se ha reportado la liberación de trampas extracelulares del neutrófilo (NET's) que también actúan como DAMP. El resultado se denomina daño pulmonar agudo (ALI) y se caracteriza por: infiltrado de neutrófilos, daño a la membrana alveolo-capilar, pérdida de la estructura alveolar, hemorragias y edema (**Figura 2**).

El exceso de fibrina debido a hemorragias generadas en los capilares alveolares forma membranas proteínicas hialinas en el intersticio. Posteriormente, como parte de los mecanismos de reparación del tejido, hay migración de fibroblastos e hiperplasia de los neumocitos tipo II que forman depósitos de colágeno en el área dañada. Como consecuencia crónica del ALI, el tejido pulmonar queda fibrosado. El ALI difuso en el parénquima que compromete la función fisiológica del pulmón es la evidencia del ARDS^{25,28}. Las citocinas no solamente ejercen su efecto en los pulmones, sino también en los riñones, el corazón, el sistema nervioso central y el hígado por lo que la falla multiorgánica es la principal complicación y causa de muerte en los pacientes que desarrollan ARDS.

Si bien los neutrófilos son células importantes en el desarrollo del ALI/ARDS y de inflamación excesiva es perjudicial al pulmón, se ha reportado que individuos con neutropenia (disminución del número de neutrófilos en circulación) también pueden desarrollar ARDS, lo cual demuestra la existencia de mecanismos inflamatorios independientes de la participación de los neutrófilos^{29,30}. Se ha estudiado la participación de diferentes tipos celulares y su participación en los procesos inflamatorios agudos, particularmente los linfocitos B y las células asesinas naturales³¹⁻³³.

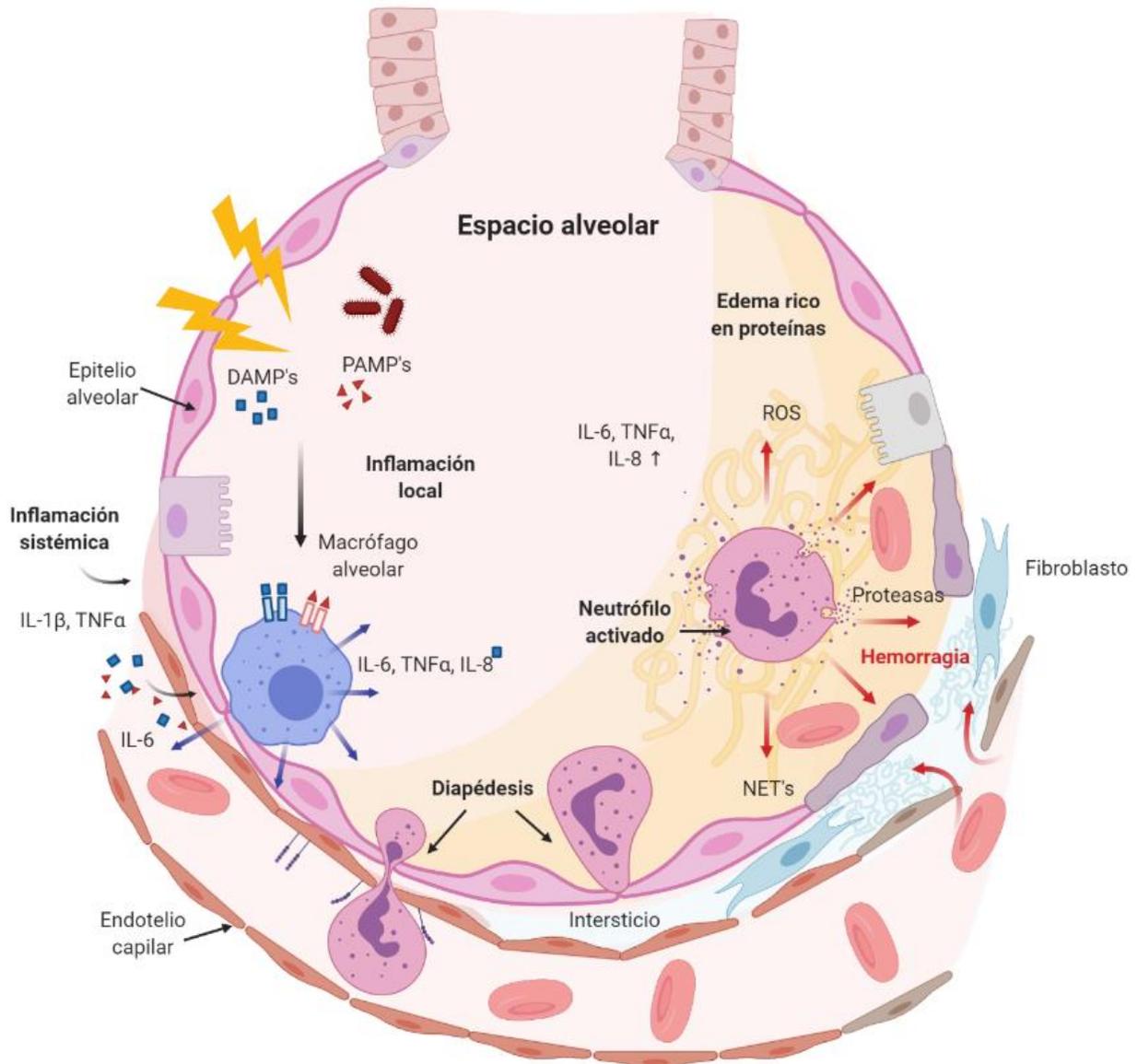


Figura 2. Desarrollo del daño pulmonar agudo (ALI).

El ALI es causado por diversos estímulos agresivos tanto locales como sistémicos. Estos estímulos causan acumulación de citocinas inflamatorias en el tejido pulmonar ocasionando la activación inespecífica de los neutrófilos y otros leucocitos en los espacios alveolares. La degranulación de los neutrófilos daña el alveolo ocasionando pérdida de la integridad de la membrana alveolo capilar, mayor infiltrado de neutrófilos, micro hemorragias y fibrosis.

Realizado con Biorender (<https://biorender.com>).

1.2 Linfocitos B (LB)

Son células linfoides productoras de anticuerpos o inmunoglobulinas. Estos anticuerpos son proteínas que se unen a un antígeno específico. Una molécula de anticuerpo tiene una estructura compuesta por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas entre si por puentes disulfuro. En esta estructura se pueden distinguir dos fragmentos: el de unión al antígeno (Fab) y la fracción cristalizante (Fc) que es reconocida por otras células y moléculas del huésped (Figura 3).

Los anticuerpos pueden dividirse en función de las diferencias estructurales de las regiones C de la cadena pesada. Las clases de anticuerpos se llaman también isotipos y se denominan IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En los seres humanos, los isotipos IgA e IgG pueden subdividirse, a su vez, en IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En los ratones, que son utilizados como modelos de estudio del sistema inmunológico, el isotipo IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (la cepa de ratones C56BL/6, carece del gen de la IgG2a, pero sintetizan un isotipo relacionado llamado IgG2c). Las regiones C de la cadena pesada de los anticuerpos de un isotipo tienen prácticamente la misma secuencia de aminoácidos. Esta secuencia es diferente en los anticuerpos de otros isotipos. En los seres humanos, las regiones C de los anticuerpos IgM e IgE contienen cuatro dominios de inmunoglobulina en tándem. Las regiones C de las IgG, la IgA y la IgD contienen solo tres dominios de inmunoglobulina.

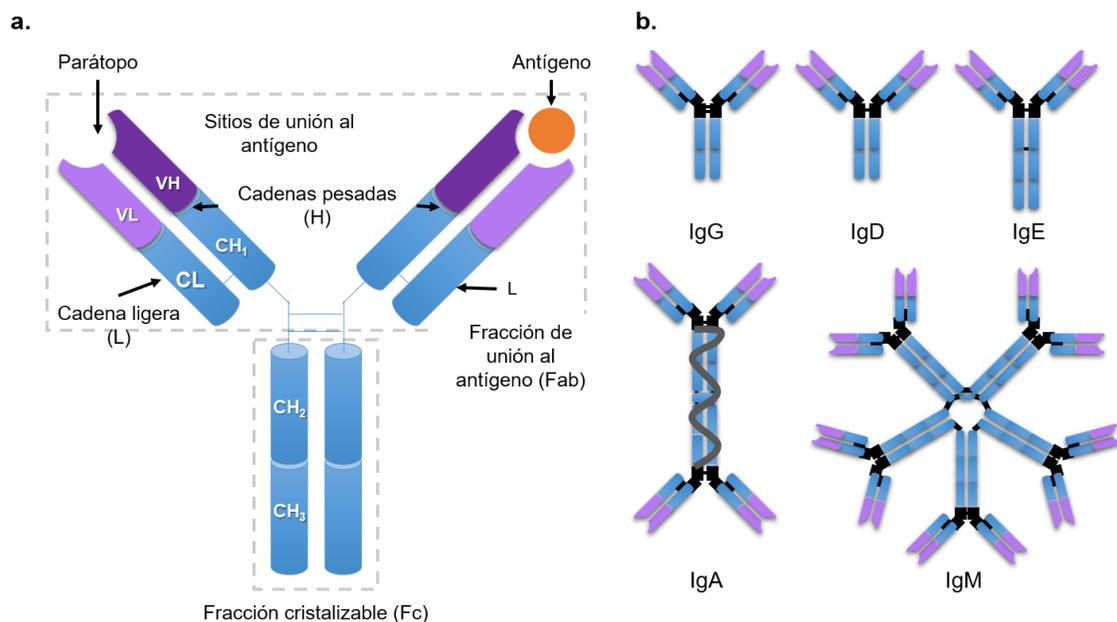


Figura 3. Estructura de un anticuerpo o inmunoglobulina.

a) Los anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena está formada por dominios constantes (C) y variables (V). La unión de los dominios variables forma el paratopo, el sitio de unión al antígeno. b) Los linfocitos B pueden sintetizar cinco clases diferentes de anticuerpos. Los anticuerpos IgG, IgD e IgE son monoméricos, IgA es secretada como dímero y e IgM es secretada como pentámero. Realizada en PowerPoint.

Los LB expresan anticuerpos, que pueden unirse a la membrana y funcionar como receptores mediante una proteína de transducción de señal formada por las proteínas CD79a y CD79b, que permiten la señalización al interior y la activación de la célula al reconocer el antígeno. Este complejo se le denomina receptor de célula B (BCR). Los anticuerpos también pueden ser secretados al medio extracelular para ejercer sus diferentes funciones biológicas: neutralizar toxinas, impedir la entrada y propagación de agentes infecciosos mediante su opsonización y eliminar células dañadas o senescentes.

La mayoría del conocimiento sobre la ontogenia, biología celular y funciones de los LB ha sido estudiado a partir de células de ratón, sin embargo, muchas características de estas células están presentes en los LB humanos. Los LB pueden ser clasificados de acuerdo con sus características inmunofenotípicas y funcionales en dos poblaciones principales: linfocitos B2 y linfocitos B1.

1.2.1 Linfocitos B-2.

Los linfocitos B-2 (B2) se producen en la médula ósea. El microambiente que forman las células del estroma de la médula ósea proporciona las señales y factores de crecimiento necesarios para la producción de LB. Los trabajos de Hardy y Rolink describieron sus estadios de maduración a través de las secuencias de los genes de las cadenas pesada y ligera que forman el BCR comparándolos con la expresión de diversos marcadores de superficie (**Figura 4**). Los B2 se originan a partir del progenitor linfoide común, la primera célula identificable comprometida a la producción de células linfoides. El progenitor linfoide común se caracteriza el fenotipo CD34⁺ CD117^{lo} Sca1⁺ CD132⁺. Una vez que el progenitor linfoide común expresa Ly6D⁺, CD45R⁺ CD43⁺ y CD117⁺ se considera que está comprometido al linaje de linfocitos B.

Durante la maduración, las células precursoras realizarán el re-ordenamiento de los segmentos VDJ y VJ de los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos, respectivamente. Las enzimas RAG-1^a, RAG-2 y TdT^b actúan sobre las secuencias genéticas de las regiones variables generando de un amplio repertorio de células capaces de reconocer diferentes antígenos a través de su BCR³⁴, y solo aquellas células que codifiquen un BCR funcional podrán abandonar la médula ósea. Al salir a circulación, los B2 inmaduros migran hasta órganos linfoides secundarios. Durante esta etapa se les denomina LB transicionales y se caracterizan por disminuir la expresión de IgM en su superficie y aumentar la expresión de IgD

^a proteína del gen activador de recombinación 1 y 2.

^b deoxinucleotidil terminal transferasa.

³⁵. Una vez que los B2 expresan IgD^{hi} e IgM^{lo} se les considera LB *naive* (vírgenes), en espera de contacto con su antígeno ^{36,37}. Los LB2 maduros pueden seguir dos destinos:

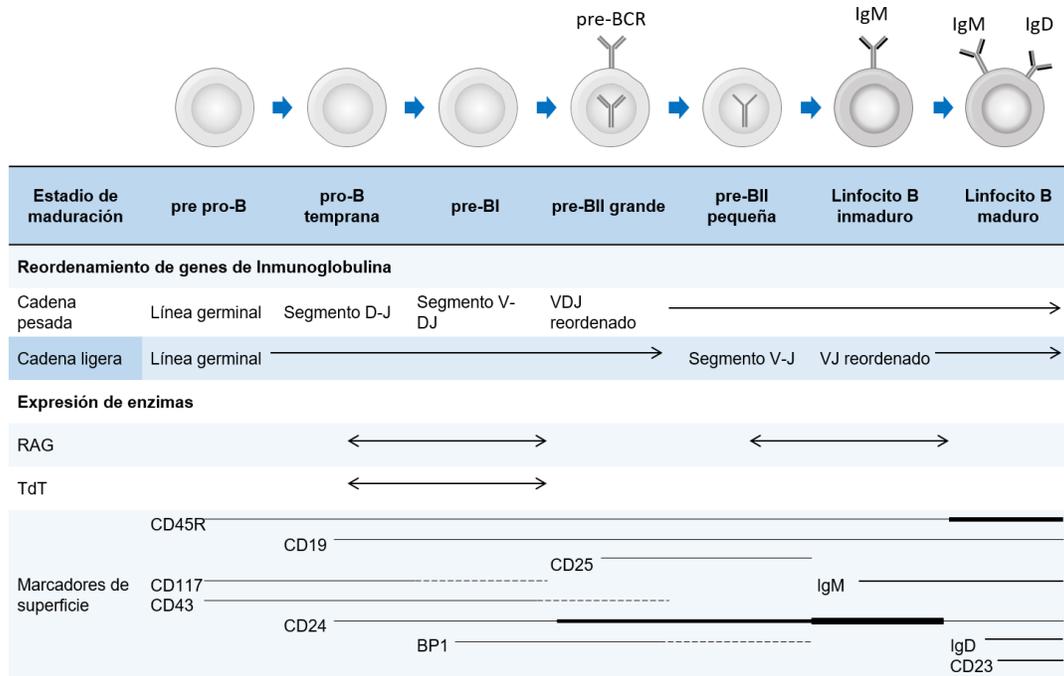


Figura 4. Estadios de maduración de los linfocitos B2 murinos en la médula ósea.

El grosor de las líneas corresponde con la intensidad de la expresión de los marcadores de superficie. Las líneas punteadas indican una expresión variable. Adaptado de Kenneth y Abbas ^{37,38}. Realizada en PowerPoint.

- Linfocitos B foliculares.** Estas células se encuentran circulando a través de la sangre, la linfa, el bazo y otros órganos linfoides. Al ocurrir la interacción antígeno-BCR, migran y se establecen en órganos linfoides secundarios e interaccionan con linfocitos T y células dendríticas (DC). Esta interacción permite al LB presentar el antígeno procesado a través de las moléculas del MHC clase II a los linfocitos T y recibir co-estimulación a través de las moléculas CD40 para activarse. Estas señales células-célula y las citocinas producidas por los linfocitos T y DC activan a los LB foliculares. A pesar que los LB foliculares expresan receptores tipo *Toll* (TLR) capaces de reconocer diferentes PAMP's, la interacción de estos con sus ligandos puede ser auxiliar, pero no suficiente para su activación ^{37,39}. Al activarse los LB, forman centros germinales, cúmulos de células linfoides en los que proliferan y diferencian; cambiando el isotipo y la afinidad de los anticuerpos. El resultado final es la generación de dos tipos celulares: células plasmáticas que producen anticuerpos del tipo IgG y que tienen una vida media de entre 12 a 20 días y LB de memoria, que permanecerán latentes y en caso de un proceso inflamatorio

posterior contra el mismo antígeno se diferenciarán a células plasmáticas. Estas células son la base de la memoria inmunológica humoral ⁴⁰.

- *Linfocitos B de zona marginal*. Pueden ser identificados a partir de la segunda a tercera semana de desarrollo en ratones y entre el primer y segundo año de vida en seres humanos. Son LB que se alojan en la zona marginal del bazo (la interfase entre la pulpa blanca y roja) y están en contacto estrecho con linfocitos T y macrófagos. En el humano, también se localiza en la pared interna de los senos sub-capsulares de los ganglios linfáticos, en las criptas de las amígdalas, en los tejidos asociadas a las mucosas (MALT) y en las placas de Peyer. Reaccionan de forma aguda contra patógenos que alcanzan la circulación sanguínea aguda produciendo anticuerpos de clase IgM e IgG3 contra los componentes de la pared celular de ciertas bacterias ⁴¹.

1.2.2 Linfocitos B-1.

Las células progenitoras que dan origen a los linfocitos B-1 (B1) pueden ser identificadas en la esplacnopleura y el hígado fetal a partir del octavo día del desarrollo embrionario del ratón. Se caracterizan por el fenotipo CD19^{hi}, AA4.1⁺ y CD43⁺ y CD45R⁻ (B220⁻). Durante la maduración de los B1, la recombinación de los genes de las cadenas pesada y ligera carece de la actividad de la enzima TdT, por lo que el repertorio de antígenos que pueden reconocer es limitado respecto al de los B2 ^{42,43}.

Después del nacimiento, estas células colonizan las cavidades peritoneal y pleural representan hasta el 30% del total de células residentes. Su proporción se reduce hasta 1% a 2% al alcanzar la adultez. A pesar de que han sido detectadas en la médula ósea murina durante las primeras semanas de vida, la capacidad de producir B1 en este órgano es limitada (10% a 20% de total) y se reduce de manera significativa hasta que alrededor de la 6^a - 8^a semana de vida la contribución de la médula ósea es nula ^{42,44}. Los B1 fueron inicialmente diferenciados de los LB convencionales por su capacidad de auto-renovación, supervivencia durante periodos largos después de experimentos de transferencia adoptiva.

Abrahão y colaboradores caracterizaron morfológicamente los B1 mediante técnicas de microscopía electrónica e inmunocitoquímica. Observaron que estas células presentan, a diferencia de los B2, pequeñas proyecciones en la membrana con abundante expresión de la integrina CD11b. Además, observaron que su núcleo es lobulado y laxo y poseen una gran cantidad de ribosomas, evidencia de un mayor síntesis de proteínas respecto a los B2 ⁴⁵.

Los B1 son productores de anticuerpos *naturales*, inmunoglobulinas de clase IgM que son secretadas de manera espontánea. Estos anticuerpos son poli-reactivos y se unen a polisacáridos y lípidos antigénicos como aquellos presentes en la superficie de bacterias, los antígenos del grupo sanguíneo AB0 y antígenos que expresan células dañadas o en apoptosis (PAMP's y DAMP's). Estos anticuerpos cooperan en la eliminación homeostática de células senescentes y de auto-antígenos, así como la opsonización de bacterias durante la fase inflamatoria aguda ⁴⁶.

Los B1 pueden identificarse por la expresión de los marcadores de superficie CD19⁺ IgM^{hi} IgD^{lo} CD43⁺ y CD23⁺. Inicialmente se describió que los B1 expresaban CD5, sin embargo, trabajos posteriores reportaron la presencia de poblaciones de B1 con características similares pero que no expresaban el marcador CD5. Con base a estas observaciones, los B1 CD5⁺ se denominan B1-a, mientras que los CD5⁻ son B1-b ⁴⁷.

Tabla 2. Marcadores de superficie que expresan las principales subpoblaciones de linfocitos B murinos y humanos.

Adaptada de Baumgarth y Rothstein^{43,44}.

Marcador	Ratón					Marcador	Humano				
	B-1a	B-1b	FO	MZ	Memoria		B-1	Naive	IgM de memoria	Memoria	Cél plasmáticas
CD5	+	+	-	-	-	CD5	+/-*	+/-**	+/-**	-	-
CD11b	mid	-	-	-	-	CD11b	+/-**	-	-	-	-
CD19	Hi	Hi	+	+	+	CD20	+	+	+	+	+
CD43	+	+	-	-	-	CD43	mid	+/-**	-	-	-
CD45	lo	lo	+	+	+	CD45	+	+	+	+	+
IgM	Hi	Hi	lo	Hi	lo/-**	IgM	mid/-*	mid	Hi	+/-*	-
IgD	lo	lo	Hi	lo	lo/-**	IgD	mid/-*	Hi	mid	-	-
CD21	+	+	mid	Hi	+/-*	CD27	+	-	+	+	+
CD23	+/-**	+/-**	Hi	+	+/-**	CD86	+/-**	-	+/-**	+/-**	CD138+ ^a

Los marcadores que se describen son de las células *ex vivo* y sin estimular.

* 50% o más de la población expresa el marcador indicado.

** 50% o más de la población no expresa el marcador indicado. a. El marcador CD138 es exclusivo de células plasmáticas.

FO. Linfocitos B foliculares.

MZ. Linfocitos B de zona marginal

1.3. Células asesinas naturales (NK).

Son células innatas de origen linfoide (ILC). Las células *asesinas naturales* (NK) representan entre el 2% y 5% de los linfocitos totales y pueden encontrarse en diferentes tejidos: sangre, bazo, hígado, pulmones, ganglios linfáticos, timo, útero y mucosas. Se desarrollan en la médula ósea, en las regiones peri-vasculares próximas a los vasos sinusoidales.

Al igual que los linfocitos T y B, las células NK se diferencian a partir del precursor linfoide común. La primera célula comprometida a su desarrollo es la pre-NK; se caracteriza por la expresión de la cadena β del receptor de IL-2 (CD122⁺). Durante su desarrollo, estas células expresarán secuencialmente diferentes receptores implicados en el reconocimiento de otras células. Una vez que expresan en superficie los marcadores CD49b y CD51 en células de ratón o CD56 en células humanas, se consideran células NK maduras ⁴⁸⁻⁵⁰ (**Figura 5**).

Las células NK no expresan el receptor de linfocitos T (TCR) ni el complejo CD3 por lo que su diferenciación de los linfocitos T se basa en estas características. Las células NK humanas expresan los marcadores CD16 y CD56 y pueden separarse con base al nivel de expresión en dos poblaciones: CD56^{Hi} CD16^{lo} y CD56^{mid} CD16^{Hi} ⁵¹. Las células NK de ratón puede ser identificadas en función de su grado de maduración y diferenciación de acuerdo a la expresión de la integrina CD11b y del receptor CD27 en 4 subpoblaciones: 1) inmaduras CD27⁻ CD11b⁻ (doble negativas; DN), 2) CD27^{hi} CD11b^{lo}, 3) CD27⁺ CD11b⁺ (doble positivas, DP) y 4) CD27^{lo} CD11b^{hi} ^{52,53}. Las diferentes subpoblaciones de células NK descritas no representan subpoblaciones desarrolladas de manera independiente sino distintas etapas de maduración y diferenciación de manera lineal de acuerdo al tejido que colonizan ^{53,54}.

Funcionalmente, las poblaciones CD27⁺ han mostrado tener la misma reactividad que las CD27^{lo} tanto en citotoxicidad natural como en la producción de citocinas y proliferación. Ambas subpoblaciones expresan niveles equivalentes de receptores de activación Ly49 y del receptor CD94/NKG2D, pero las células CD27^{lo} contienen un nivel mayor de expresión del receptor inhibitorio Ly49s lo cual puede explicar su menor capacidad citotóxica.

A pesar de las diferencias en los marcadores de humano y ratón, se ha sugerido que las células NK CD27⁺ correlacionan funcionalmente con las CD56^{Hi} del humano. También se ha caracterizado una subpoblación de células NK atípica en el bazo murino, denominada CD127⁺ GATA-3⁺ (45).

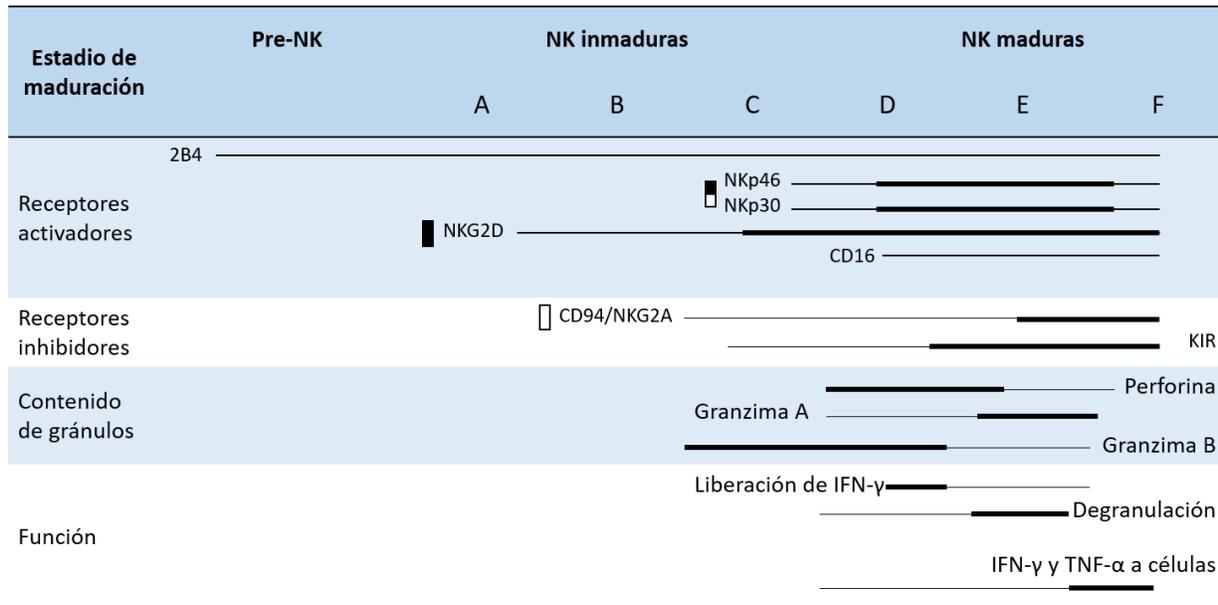
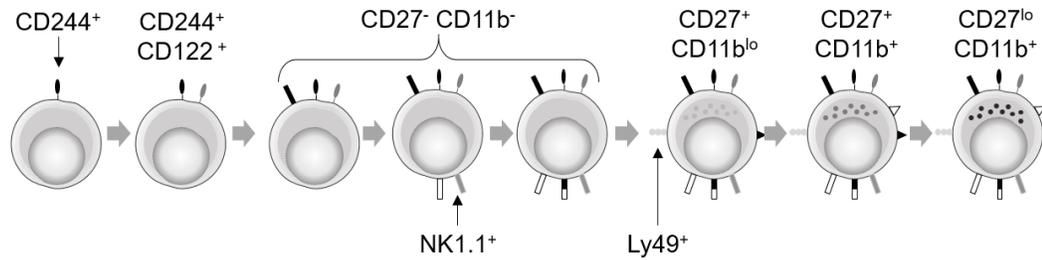


Figura 5. Estadios de maduración de las células NK murinas en la médula ósea.

El grosor de las líneas corresponde con la intensidad de la expresión de los marcadores de superficie. Adaptado de Cichoki, y Abel⁴⁸⁻⁵⁰. Realizado en PowerPoint.

La principal función de estas células es el reconocimiento y destrucción de células propias infectadas y/o transformadas. Este reconocimiento es a través de un conjunto de receptores que identifican moléculas en la superficie de la célula blanco. Los receptores de las células NK pueden ser de activadores, inhibidores o de co-estimulación^{55,56}:

- **Receptores activadores.** Se unen a ligandos asociados a células dañadas, infectadas por virus u otras moléculas “no propias” en las células del hospedero. Ejemplo de estos son: receptores murinos Ly49D, Ly49H y el heterodímero CD94/NKG2C que se unen a antígenos asociados al MHC clase I (MHC-I); NKp46 y NKp44 que reconocen hemaglutininas virales, proteoglicanos y proteínas de parásitos expresadas en la membrana de la célula infectada. En células humanas los receptores KIR2DS reconocen proteínas del HLA.
- **Receptores inhibidores.** Se unen a proteínas del MHC-I de manera péptido-

independiente, a moléculas de supervivencia y otras que identifican como propia a la célula blanco ⁵⁷. Algunos ejemplos son: los receptores murinos Ly49A, Ly49C, Ly49I, Ly49P y el heterodímero CD94/NKG2A que reconocen moléculas MHC clase I y relacionadas. En células humanas los receptores KIR2DL reconocen proteínas del HLA.

- *Receptores co-estimuladores.* Amplifican las señales provistas por los otros receptores para inducir una respuesta celular. Entre estos están NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1C y NKR-P1D.

Si la célula NK entra en contacto a través de sus receptores con una célula blanco, se produce una sinapsis inmunológica. El balance entre las señales de activación e inhibición que la célula proporcione determinará si es ignorada o destruida. Cuando las señales son suficientes para identificarla como extraña, la célula NK puede atacarla mediante diferentes mecanismos ⁴⁸ :

- *Liberación de IFN- γ en la proximidad de la célula blanco.* La acumulación del IFN- γ permite la activación de LB, linfocitos T, macrófagos y DC's que pueden eliminar a la célula blanco.
- *Degranulación.* Las células NK maduras liberan las enzimas citotóxicas perforina y granzima sobre sus blancos. Estas enzimas se encuentran almacenadas en gránulos y al liberarse actúan de manera sinérgica. La perforina se polimeriza rápidamente formando poros en la membrana de la célula facilitando la entrada de las granzimas. Las granzimas son proteasas de serina que activan las caspasas e inician la vía intrínseca de la apoptosis.
- *Interacción con receptores de muerte.* Tras la sinapsis inmunológica, la célula NK puede activar la vía extrínseca de la apoptosis en su célula blanco mediante la activación de receptores de muerte a través de IFN- γ , TNF- α , Fas u otras moléculas como TRAIL.

La activación de las células NK lleva a la pérdida de expresión del CD27, CD11b, CD16 y CD62L y favorece la de CD25 y CD69. Se ha demostrado que el fenotipo de las células NK en los ratones varía considerablemente dependiendo del ambiente de citocinas (54). En particular, la IL-15, que sola o en combinación con IL-18 o IL-12 induce la regulación a la baja de CD11b, CD43 y CXCR4 y la sobre regulación de CD25 (53).

1.4 Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS).

Las hipótesis experimentales sobre el ARDS muchas veces son difíciles de demostrar debido a la dificultad que representa el controlar las variables clínicas de los pacientes en condiciones críticas. El uso de ratones como modelos experimentales ha sido una de las principales herramientas para estudiar los mecanismos fisiológicos e inmunológicos del ARDS. Debido a que se ha estudiado ampliamente su fisiología, se ha secuenciado el genoma de varias cepas de ratones de laboratorio, la facilidad en su manejo y mantenimiento en el laboratorio, los modelos murinos continúan siendo una herramienta valiosa necesaria para el estudio de diversas enfermedades. Es importante notar que las respuestas observadas en el ratón pueden ser similares pero no necesariamente extrapolables al humano, ya que las diferencias entre ambos organismos son evidentes (**Tabla 3**)⁵⁸.

Tabla 3. Principales diferencias relacionadas con la anatomía pulmonar y el sistema inmunológico entre el ratón y el humano.

Adaptado de Mestas y Matute-Bello^{58,59}.

	Ratón	Humano
<i>Anatomía pulmonar</i>	Pulmón derecho compuesto por lóbulo craneal, medio, caudal y accesorio. Un solo lóbulo en pulmón izquierdo	Bilobulado
<i>Arterias bronquiales</i>	Ausentes	Presentes
<i>Tejido linfoide asociado a bronquios</i>	Considerable	Ausente en tejido sano
<i>Neutrófilos en sangre periférica</i>	10% - 25%	50% - 70%
<i>Linfocitos en sangre periférica</i>	75% - 90%	30%-50%
<i>TLR-3</i>	Expresado en DC y Macrófagos. Inducida por LPS.	Expresado en DC. No inducida por LPS
<i>Receptores inhibidores de células NK</i>	Ly49 (excepto D y H)	KIR
<i>Clases de Inmunoglobulinas</i>	IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a*, IgG2b, IgG3, IgM *Ausente en C57BL/6	IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM
<i>Expresión de CD5 y CD23 en linfocitos B</i>	Mutuamente excluyentes	Co-expresión

En el modelo animal de ARDS es necesario inducir los cambios fisiológicos y patológicos observados en el ser humano utilizando estímulos inflamatorios similares a los que provocan el síndrome en el ser humano. La administración de LPS, bacterias viables y soluciones ácidas por vía intratraqueal e intranasal así como la generación de sepsis mediante administración

intraperitoneal de LPS o ligadura y punción cecal (CLP) son los estímulos inflamatorios utilizados por diversos equipos de investigación de ARDS^{59,60}. Las cepas de ratones CD-1, C57BL/6 y BALB/c son las más utilizadas para estos modelos ya que se han documentado diferentes grados de susceptibilidad al LPS y generación de ALI, siendo la cepa C57BL/6 la más resistente y que responde a dosis en aumento de LPS con una respuesta inflamatoria progresiva.⁶¹

De acuerdo a Matute-Bello y D' Alessio^{62,63}, los modelos murinos deben cumplir con 3 de 4 criterios para poder ser utilizados en el estudio del ARDS: 1) alteración de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar, 2) evidencia histológica del daño al tejido pulmonar, 3) presencia de infiltrado de neutrófilos y 4) disfunción fisiológica del pulmón.

Durante los últimos años se han realizado diversos trabajos para identificar el papel que desempeñan las células linfoides en los procesos inflamatorios agudos. Kim y cols. sentaron las bases de trabajos posteriores al demostrar que los linfocitos participan durante las primeras 6 h del proceso inflamatorio y que no están a la expectativa hasta desarrollar una respuesta adaptativa. Utilizando un modelo animal con ratones BALB/c en los que fue inducida sepsis a través de la administración intraperitoneal de dosis sub-letales de poli (I:C)^c, Kim observó que los ratones *Rag*^{-/-} (incapaces de producir linfocitos funcionales) sobreviven menos y tienen concentraciones plasmáticas mayores de TNF α e IFN- γ respecto a los organismos *wild-type*³¹.

Posteriormente, Kelly-Scumpia y cols. utilizaron ratones C57BL/6 *μ MT*^{-/-} (desprovistos de LB funcionales) a los que se les indujo sepsis mediante CPL^d; y observaron que estos ratones tenían una supervivencia menor, concentraciones plasmáticas menores de citocinas relacionadas con la inmunidad innata (IL-1 β , IL-6 e IFN- γ), así como una cuenta mayor de UFC de microorganismos en cavidad peritoneal respecto a los organismos *wild-type*³². Kelly-Scumpia verificó esta observación mediante la depleción de LB con anticuerpo anti-CD20 en un organismo *wild-type*. Estos trabajos sugieren que los LB son necesarios para regular la producción de citocinas en una respuesta inflamatoria aguda y que pueden participar en la depuración de los agentes infeccioso. Esta función parece ser antígeno-independiente ya que no depende de la producción de anticuerpos específicos sino de la producción de citocinas. En el mismo trabajo, Kelly-Scumpia identificó que la función protectora de los LB dependía de la estimulación con IFN de tipo I utilizando ratones deficientes del receptor de IFN clase I (*IFNRA*^{-/-})³².

c. Ácido poliinosítico: policitidílico; es un ligando del receptor TLR3 de estructura similar al RNA de doble cadena.

d. La ligadura y punción cecal es un método quirúrgico en el que se realizan punciones en el ceco murino permitiendo un vaciamiento parcial del contenido intestinal en la cavidad peritoneal desencadenando un proceso séptico.

En 2012, Rauch y cols. estudiaron la expresión del factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF) en el bazo de ratones tras la administración de LPS por vía intraperitoneal. El GM-CSF es una citocina de naturaleza glicoproteínica que favorece la producción de células PMN y monocitos, la proliferación y maduración de neutrófilos.

Descubrieron que la principal fuente celular de esta molécula eran LB. Al caracterizar estas células fueron identificadas como linfocitos B1 (CD19⁺ B220⁺ GM-CSF⁺ IgM^{Hi} CD23^{lo} CD43^{Hi} CD5^{mid} CD138⁺ VL4^{Hi} CD93⁺ TLR-4⁺) y se les nombró LB activadores de la respuesta innata (del inglés, *Innate Response Activator*; IRA) dados los efectos que tiene el GM-CSF en las células de la inmunidad innata ⁶⁴.

Rauch observó que las células IRA proliferaban en la pulpa roja del bazo ante el estímulo del LPS. En ensayos de sepsis inducida por CLP, observó que ratones quimera con deficiencia de LB productores de GM-CSF (quimera *Csf^{-/-}*) tenían un menor porcentaje de supervivencia, un incremento en el número de neutrófilos en cavidad peritoneal, concentraciones elevadas de IL-1 β , IL-6, y TNF- α en suero y en el peritoneo, así como una mayor cuenta de UFC en cavidad peritoneal respecto a los ratones *wild-type*.

Basado en el trabajo de Rauch, Weber y cols. utilizaron dos modelos de neumonía en ratones C57BL/6: 1) por administración intratraqueal de *E. coli* y 2) por administración intranasal de 20 μ g de LPS. Observaron que, en respuesta a la inflamación inducida, los B1-a migraban desde la cavidad pleural hasta el parénquima pulmonar liberando IgM poli-reactiva. Esta función de los B1-a es dependiente de la presencia de LB IRA y de la producción de GM-CSF ⁶⁵. Utilizando organismos quimera *Csf^{-/-}*, pudieron demostrar que la ausencia de células IRA incrementa la respuesta inflamatoria, pero disminuye la cantidad de IgM secretada por B1-a.

Aziiz y cols. reportaron que, durante la sepsis inducida en ratones tras CLP, el número de B1 disminuía en diferentes regiones anatómicas. La transferencia adoptiva de B1 productores de IL-10 disminuían la concentración de citocinas inflamatorias y aumentaba la supervivencia de los ratones tratados. Los LB B-1 deletados del gen de IL-10 no disminuyeron la reacción pro-inflamatoria ni aumentaron la supervivencia de los ratones ⁶⁶. Estos resultados indican la capacidad que los LB, particularmente los B1, para modular la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citocinas en los diferentes contextos de los trabajos mencionados.

Por otro lado, la participación de las células NK en el proceso inflamatorio sistémico y local, dada su capacidad citotóxica natural contra células infectadas por virus y células malignas, ha sido estudiada ampliamente ⁶⁷⁻⁷⁰.

Las funciones efectoras convencionales de las células NK de inducir una potente defensa

inflamatoria contra patógenos a través de su actividad citotóxica y la producción de citocinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ) están bien establecidas ⁷¹⁻⁷³; sin embargo, las células NK también pueden regular las respuestas inmunes a varios patógenos al producir la citocina antiinflamatoria IL-10 durante la infección sistémica ⁷⁴. La última función puede ser beneficiosa para el huésped al protegerlo de la patología de tejidos y órganos mediada por el sistema inmunitario no controlada; o puede serle perjudicial al promover la inmunosupresión y la consecuente persistencia y propagación del patógeno. Las células NK con actividad inmuno-regulatoria se han identificado en diversos modelos de enfermedades infecciosas sistémicas en ratones y en varias enfermedades crónicas en humanos ⁷⁰. La infección por citomegalovirus murino (MCMV), la malaria cerebral experimental (MEC) y la sepsis inducida por CLP son los tres modelos animales de infección sistémica en los que se ha demostrado una función inmuno-reguladora beneficiosa a través de la producción de IL-10 ⁷⁵⁻⁷⁷. Por otro lado, la leishmaniasis visceral experimental y la infección sistémica por *Listeria monocytogenes* son los dos modelos que han mostrado un efecto perjudicial sobre la resistencia del huésped inmune frente al patógeno ⁷⁸⁻⁸⁰.

En enfermedades humanas, también se ha informado la presencia de células NK con actividad inmuno-regulatoria en la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y la sepsis en humanos ⁸¹⁻⁸³. El papel dual que presentan las células NK, pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, debe ser revisado ya que podría ser un mecanismo blanco para posibles tratamientos en caso de infecciones sistémicas que producen una alta mortalidad. En el caso de ARDS/ALI, el papel de las células NK inmuno-regulatorias no ha sido estudiado todavía, y podría ser un área de estudio relevante debido a que el pulmón es un órgano susceptible a gran variedad de infecciones que cuando no son controladas adecuadamente producen una respuesta inflamatoria que daña a este órgano y puede conducir a la muerte ³³.

Por lo anterior, en este estudio se exploró la distribución y el fenotipo de las células NK y de subpoblaciones de linfocitos B en el microambiente pulmonar en animales sanos y durante el desarrollo del ALI inducido por lipopolisacárido (LPS) utilizando un modelo murino. Dichas poblaciones celulares también fueron analizadas en la cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo, como microambientes de comparación.

2. JUSTIFICACIÓN

Se conoce poco acerca de la participación de los linfocitos B y las células NK en el daño pulmonar agudo inducido por ARDS, al estudiar la distribución y el fenotipo de los linfocitos B y células NK en el microambiente pulmonar se pueden plantear nuevas perspectivas sobre el proceso inflamatorio agudo en el pulmón, así como identificar células blanco candidatas a tratamientos que permitan disminuir la mortalidad asociada al ARDS.

3. HIPÓTESIS

Las subpoblaciones de LB y células NK se distribuyen específicamente y presentan un fenotipo determinado en el tejido pulmonar durante la inducción del daño pulmonar agudo (ALI).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la distribución y el fenotipo de las poblaciones de linfocitos B y células NK en el tejido pulmonar en un modelo murino de daño pulmonar agudo (ALI) inducido por lipopolisacárido (LPS).

4.2. Objetivos particulares

- Validar la inducción del ALI determinando el infiltrado de neutrófilos en pulmón mediante histología y citometría de flujo en ratones tratados y no tratados con LPS.
- Validar la inducción del ALI mediante la medición de la concentración de proteínas y celularidad de lavado bronco alveolar de ratones tratados y no tratados con LPS.
- Determinar la distribución y fenotipo de subpoblaciones de LB en tejido pulmonar de ratones con ALI y ratones controles.
- Determinar la distribución y los estadios de maduración de células NK en tejido pulmonar de ratones con ALI y ratones controles.
- Determinar la distribución y fenotipo de subpoblaciones de LB en el bazo, cavidad pleural y peritoneal de ratones con ALI y ratones controles.
- Determinar la distribución y los estadios de maduración de células NK en el bazo, cavidad pleural y peritoneal de ratones con ALI y ratones controles.

5. METODOLOGÍA

5.1 Ratones

Se usaron ratones C57BL/6 hembras de 8 a 12 semanas de edad, con un peso entre 18 y 22 g. Fueron mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en condiciones asépticas (sustrato, agua y alimento previamente esterilizado), con ciclos alternados de luz-oscuridad de 12 h, en un rango de temperatura entre 22° y 25° C, y con acceso a agua y alimento *ad libitum*. El uso de estos animales fue autorizado por el comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y fue realizado de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y guías internacionales de cuidado y manejo de animales de laboratorio.

5.2 Modelo de daño pulmonar agudo (ALI).

5.2.1. Administración de lipopolisacárido (LPS) por vía intranasal.

Los ratones fueron sedados con ketamina (100 µg/g de peso por vía i.p.) y recibieron por vía intranasal 20 µL de solución de LPS (Sigma-Aldrich, Cat. L2880), 10 µL por cada orificio nasal en una sola descarga (**Figura 7**) utilizando una punta de micropipeta de 10 µL. A cada ratón se le administró una dosis única de LPS y probando tres dosis diferentes en cada experimento: 20 µg, 50 µg y 100 µg, utilizando solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) como vehículo. Los ratones control fueron administrados con PBS. En total se realizaron 7 series de experimentos independientes y en cada serie de experimentos se utilizaron 2 ratones por cada condición (control y tratamientos con LPS). Los animales fueron sacrificados 24 h después mediante una sobredosis de ketamina (500 µg/g de peso por vía i.p.) y por sección cervical. Cada serie de experimentos independientes corresponde a dos series de ratones inoculados el mismo día con los tratamientos antes descritos.



Figura 7. Administración intranasal en ratones sedados.
Tomada de Terryn⁸⁴.

5.2.2. Lavado bronco alveolar (BAL).

El cuerpo de cada ratón fue asegurado a una tabla de disección en posición decúbito dorsal. La garganta del ratón fue cortada longitudinalmente para exponer la tráquea. Utilizando un bisturí, la tráquea fue cortada transversalmente para permitir que un catéter intravenoso calibre 24 se insertara (Catéter *Insyte* 24G, Becton Dickinson). El catéter fue asegurado con hilo quirúrgico de polyester no. 0 para evitar cualquier fuga (**Figura 8**). Con ayuda de una jeringa de 1 mL se inyectaron 2.0 mL de PBS estéril frío en dos tomas de 1.0 mL, y el volumen se colectó en un tubo de microcentrífuga. La suspensión fue centrifugada a 1,000 g por 5 min a 4° C. El sobrenadante fue colectado en otro tubo y almacenado a -20° C hasta la cuantificación de proteínas totales. El botón celular fue suspendido en 100 µL de *CarboWax* 2% (Sigma Aldrich, cat. 10783641001) y almacenado por 24 h en refrigeración.

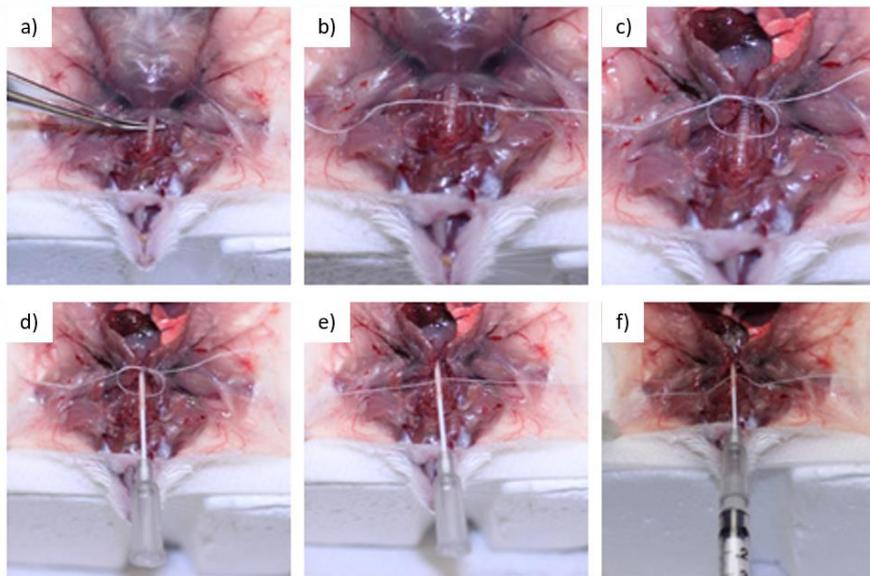


Figura 8. Procedimiento para realizar el lavado broncoalveolar.

a) Localización de la tráquea, b) y c) anudado del hilo alrededor de la tráquea, d) corte de la tráquea e introducción del catéter, e) fijado del catéter e f) inyección de solución PBS para lavado broncoalveolar. Modificada de Sun ⁸⁵.

5.2.3. Cuantificación de proteínas en lavado broncoalveolar

La concentración de proteínas totales presentes en los sobrenadantes de los lavados bronco-alveolares (BAL) se determinó utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (ThermoFisher; Cat. 23225). Siguiendo las instrucciones del fabricante. En una placa de 96 pozos se colocaron 25 µL de sobrenadante de BAL y 200 µL de la solución de trabajo (mezcla 50:1 de reactivos A y B del kit). La placa fue incubada a 37° C por 30 min y posteriormente se realizó su lectura a una

longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad. Para cada condición experimental se realizaron tres lecturas. La concentración de cada muestra fue calculada utilizando una curva estándar de albúmina bovina (Sigma-Aldrich, Cat. A7030). El resultado de cada condición por experimento se reportó como el promedio de las tres lecturas.

5.2.4. Tinción diferencial de células en BAL

Posterior a que las células estuvieron en *CarboWax* 2% (Sigma Aldrich, cat. 10783641001) por 24 h, el botón celular obtenido del BAL fue teñido utilizando H&E y se realizó el conteo diferencial de las células.

5.2.5. Aislamiento de tejido pulmonar para histología.

La tabla de disección se colocó con una inclinación de aproximadamente 10° respecto a la porción caudal del ratón. Utilizando el equipo de disección, la caja torácica fue abierta y las costillas cortadas con el fin de exponer los pulmones. Utilizando la cánula con la que se realizó el lavado broncoalveolar, los pulmones fueron perfundidos lentamente con 10 mL de formol tamponado al 10%. Después, la cánula fue retirada y el hilo anudado para evitar que el formol se fugara del tejido. Con mucho cuidado, los pulmones fueron retirados y colocados dentro un tubo de fondo cónico con 30 mL de formol tamponado al 10%. El tejido fue almacenado a temperatura ambiente por 24 h.

Posteriormente, el tejido fue incluido en un bloque de parafina utilizando el protocolo de tinción con hematoxilina y eosina (HE). Los ratones cuyos pulmones fueron utilizados para obtener cortes histológicos no fueron procesados para el aislamiento de células para tinción con anticuerpos fluorescentes.

5.2.6. Aislamiento de células de pulmón

La cavidad torácica fue expuesta de manera idéntica a la descrita en el procesamiento del tejido pulmonar para histología. Los pulmones fueron perfundidos a través de la aurícula derecha del corazón con 10 mL de PBS estéril frío. El tejido fue retirado y colocado en una caja de Petri, para que fuese macerado y cortado en pedazos de aproximadamente 1 mm. A los pedazos les fue adicionado 5 mL de una solución de colagenasa II y IV (Worthington Biochem, Cat. LS004174 y LS004186) / DNAsa (Sigma-Aldrich, Cat. DN25) en medio RPMI 1640 (10 mg/ 10 mg/ 1 U/ mL); esta suspensión fue incubada a 37° C por 40 min. Transcurrido este la suspensión fue pasada a través de una aguja calibre 24 y de una malla de nylon estéril de 40 µm

para homogeneizar. La suspensión fue colectada en un tubo de fondo cónico de 15 mL, y fue lavada en dos ocasiones con 10 mL de medio RPMI 1640 y centrifugada a 1,500 g por 5 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y el botón celular fue suspendido en 3 mL de medio RPMI 1640. La suspensión celular fue colocada sobre un gradiente discontinuo de 2 mL de Percoll (Sigma-Aldrich, Cat. P4937) al 40% y 2 mL de Percoll al 70% en un tubo de 15 mL, evitando que se mezclaran las diferentes fases (**Figura 9**). Este gradiente fue centrifugado a 1,500 g por 20 min a 4° C, sin utilizar el freno. Posteriormente, se colectaron las células presentes entre las fases del Percoll al 40% y la superior, se colocaron en un tubo nuevo de 15 mL y fueron lavadas a un volumen final de 15 mL con medio RPMI 1640 y centrifugadas a 1,500 g por 5 min a 4° C.

El botón celular se suspendió en 5 mL de medio RPMI 1640. Las células se conservaron en refrigeración por un tiempo no mayor a 2 h hasta su utilización. Las células obtenidas fueron contadas con ayuda de una solución de azul de tripano 0.04% en PBS 1x (Sigma-Aldrich, Cat. 93595) y una cámara de Neubauer.

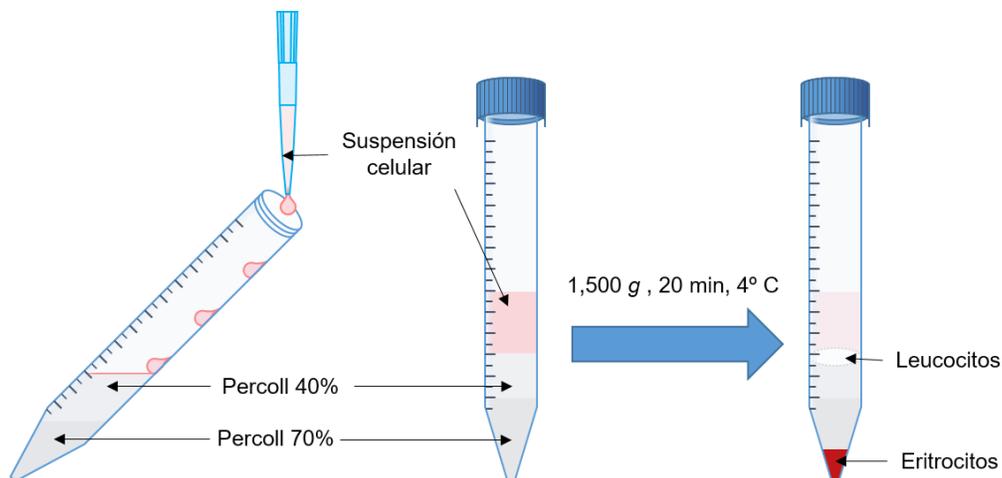


Figura 9. Preparación del gradiente de Percoll al 40% y 70% para separación de leucocitos
Realizada en PowerPoint.

5.3. Determinación de la distribución de subpoblaciones de LB y estadios de maduración de células NK

Para este grupo de experimentos, la generación del daño pulmonar agudo se realizó de la manera que se describe en la 5.2, en los apartados *administración de LPS por vía intranasal* y *aislamiento de células de pulmón*. Adicionalmente al estudio de las células de pulmón, se aislaron células de cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo con el objetivo de comparar las

diferentes subpoblaciones de LB y estadios de madurez de las células NK en diferentes tejidos.

5.3.1. Aislamiento de células de la cavidad peritoneal

El cuerpo del ratón fue asegurado en la tabla de disección en posición decúbito dorsal. Con ayuda de un equipo de disección, la piel que recubre la región ventral del ratón fue retirada, teniendo cuidado de no romper la membrana de la cavidad peritoneal. Utilizando una jeringa de aguja calibre 25 se inyectó en la cavidad 5 mL de PBS + 1% de suero fetal bovino (FCS) estéril frío. Sin retirar la aguja, se realizó un suave masaje con los dedos en la cavidad. Después, el lavado de la cavidad peritoneal fue extraído y el volumen colectado fue depositado en un tubo de fondo cónico de 15 mL. Las células en suspensión fueron lavadas con 10 mL de medio RPMI 1640, centrifugadas a 1,000 g por 5 min a 4° C y el botón celular suspendido en 500 µL de medio RPMI 1640. Las células se conservaron en refrigeración por un tiempo no mayor a 2 h hasta su utilización.

5.3.2. Aislamiento de células de la cavidad pleural

Una vez realizado el lavado de la cavidad peritoneal, la membrana fue cortada exponiendo los órganos y la base de la caja torácica. La placa de disección fue levantada con una inclinación de aprox. 10° de la parte inferior. Apartando el hígado y utilizando una jeringa de aguja calibre 27 se inyectó 1 mL de PBS con 1% de FCS estéril frío en la cavidad pleural, teniendo cuidado de no picar el tejido pulmonar o perforar la membrana. La jeringa no se retiró. La placa fue levantada con una inclinación similar, pero en la parte superior. Se colectó la suspensión con la jeringa y el volumen se depositó en un tubo de microcentrifuga. Las células fueron separadas a 1,000 g por 5 min a 4° C y se suspendió el botón celular en 500 µL de medio RPMI 1640. Las células se conservaron en refrigeración por un tiempo no mayor a 2 h hasta su utilización.

5.3.3. Aislamiento de células de bazo

El bazo fue retirado, colocado dentro de una caja de Petri y disgregado por presión con ayuda de un émbolo de jeringa de 1 mL. Se añadieron 2 mL de PBS estéril, se homogeneizó la suspensión celular y fue transferida a un tubo de fondo cónico de 15 mL. Las células fueron lavadas en dos ocasiones con 10 mL de medio RPMI 1640 y centrifugadas a 1,500 g por 5 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y el botón fue suspendido en 5 mL de solución de lisis (Biolegend, Cat. 420302) por 5 min en baño de hielo. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 10 mL de medio RPMI 1640 frío y se centrifugó a 1,500 g por 5 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se suspendió en 3.0 mL de medio RPMI 1640. Las células se

conservaron en refrigeración por un tiempo no mayor a 2 h hasta su utilización.

Las células obtenidas de, bazo, cavidad pleura, cavidad peritoneal y bazo fueron contadas con ayuda de una solución de azul de tripano 0.04% (Sigma Aldrich, cat. 93595) en PBS 1x y una cámara de Neubauer.

5.4. Citometría de flujo

Las células obtenidas de pulmón, cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo fueron teñidas con paneles de anticuerpos fluorescentes específicos de acuerdo al siguiente procedimiento (**Tablas 4 - 6**).

Las células fueron colocadas en tubos de polipropileno de 5 mL y lavadas con 2 mL de PBS 1x en dos ocasiones, centrifugando a 1, 500 g por 5 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y el botón celular suspendido en un volumen final de 50 µL de buffer PBA. A cada tubo le fue adicionado 50 µL de una dilución 1:400 de Zombie Aqua (Biolegend, cat. 423101). Las células en suspensión fueron incubadas en refrigeración durante 15 min en oscuridad. Después, las células fueron lavadas con buffer de tinción (Biolegend, cat. 420201) y suspendidas en un volumen final de 50 µL. Un volumen de 50 µL de anticuerpos fluorescentes diluidos en buffer de tinción fue agregado a cada tubo y fueron incubados en refrigeración por 15 min en oscuridad. Después, las células fueron lavadas con 2 mL de buffer PBA en dos ocasiones, centrifugando a 1, 500 g por 5 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y el botón celular suspendido en 100 µL de buffer de fijación (Biolegend, Cat. 420801) durante 20 min en refrigeración. Se realizaron dos lavados con 1 mL de buffer PBA como se describió anteriormente y finalmente el botón celular fue suspendido en un volumen final de 200 µL. Los tubos fueron conservados en refrigeración y cubiertos de la luz hasta su lectura.

Para las células de pulmón y bazo fueron teñidas 3×10^6 células por cada condición experimental. Para los tubos de controles de calibración, FMO (*Fluorescence Minus One*) y controles de isotipo fueron utilizadas 10^5 células.

Para las células de cavidad pleural y peritoneal fueron teñidas 1×10^6 células por cada condición experimental. En los casos en que la cantidad de células obtenidas fue menor, se utilizó el total de células colectadas de cada ratón.

Tabla 4. Panel para identificación de neutrófilos en tejido pulmonar.

Marcador	Clona	Fluorocromo	Dilución	Isotipo	Marca	No. catálogo
CD45	30-F11	AF488	1:400	Rata IgG2b, κ	Biolegend	103121
Ly6G	1A8	PE	1:200	Rata IgG2a, κ	Biolegend	127608
	RTK2758	PE		Isotipo ^a	Biolegend	400507

Tabla 5. Panel para la inmunofenotipificación de linfocitos B.

Marcador	Clona	Fluorocromo	Dilución	Isotipo	Marca	No. catálogo
CD19	6D5	PE/ DAZZLE	1:200	Rata IgG2a, κ	Biolegend	115554
CD5	53-7.3	PerCP/Cy5.5	1:200	Rata IgG2a, κ	Biolegend	100623
	RTK2758	PerCP/Cy5.5		Isotipo	Biolegend	400531
CD11b	M1/70	PE/Cy7	1:200	Rata IgG2b, κ	Biolegend	101216
	RTK4530	PE/Cy7		Isotipo	Biolegend	400617
CD69	H1.2F3	APC/Cy7	1:200	Hamster Armenio IgG	Biolegend	104525
	HTK888	APC/Cy7		Isotipo	Biolegend	400927
CD45	30-F11	BV605	1:400	Rata IgG2b, κ	Biolegend	103139
Viabilidad		Zombie Aqua	1:400	NA	Biolegend	423101

Tabla 6. Panel para identificación de estadios de maduración de células NK.

Marcador	Clona	Fluorocromo	Dilución	Isotipo	Marca	No. catálogo
CD3ε	145-2C11	FITC	1:200	Hamster Armenio IgG	Biolegend	100305
CD27	LG.3A10	PE	1:200	Hamster Armenio IgG	Biolegend	124210
	HTK888	PE		Isotipo	Biolegend	400907
NK1.1	S17016D	PerCP/Cy5.5	1:200	Ratón IgG2a, κ	Biolegend	156525
CD11b	M1/70	PE/Cy7	1:200	Rata IgG2b, κ	Biolegend	101216
	RTK4530	PE/Cy7		Isotipo	Biolegend	400617
CD69	H1.2F3	APC/Cy7	1:200	Hamster Armenio IgG	Biolegend	104525
	HTK888	APC/Cy7		Isotipo	Biolegend	400927
CD45	30-F11	BV605	1:400	Rata IgG2b, κ	Biolegend	103139
Viabilidad		Zombie Aqua	1:400	NA	Biolegend	423101

Las células fueron leídas en un equipo Becton Dickinson FACS Aria II TM con la configuración óptica indicada en la **Tabla 10**. Los datos de citometría fueron adquiridos con BD FACSDivaTM Software v6.2 (Becton Dickinson) y analizados con FlowJo X v.10.0.7 (Becton Dickinson, 2016).

Tabla 7. Configuración óptica del citómetro BD FACS Aria II™ utilizado para la adquisición.

Láser	PMT ^a	Filtros	Fluorocromos que son detectados
Azul 488 nm	A 780/60	735LP	PE/Cy7
	B 695/40	690LP	PerCp, PerCP-Cy5.5
	C 660/20	655LP	PeCy5
	D 610/20	595LP	PE Texas Red, PI, PE/CFS94
	E 576/26	556LP	PE
	F 530/30	502LP	FITC, AF488, CFSE, GFP
	G	488/10	SSC
	H	---	---
Rojo 633 nm	A 780/60	735LP	APC-Cy7
	B 730/45	710LP	AF700
	C 660/20	---	APC, AF647
Violeta 405 nm	A 530/30	502LP	Amcyan, Aquadye, UV500
	B 450/50	---	Pacific Blue, DAPI
	C		Falta checar los filtros de BV605

a. Del Inglés *PhotoMultiplier Tubes*, tubos fotomultiplicadores: detectores con los que cuenta el equipo.

5.5. Análisis estadístico

El número de experimentos independientes para la validación del modelo de ALI fue de 7 y para los experimentos posteriores fue de 5. Las barras de error en las gráficas de barras corresponden a la desviación estándar del promedio.

Se verificó la normalidad de los resultados mediante las pruebas de D'Agostino – Pearson y Shappiro-Wilk. Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrica) para identificar si existían diferencias entre los tratamientos y Mann-Whitney para realizar comparaciones entre tratamientos. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, 2019).

6. RESULTADOS

6.1. Validación del modelo de daño pulmonar agudo.

Con el objetivo de verificar que la administración de LPS por vía intranasal era capaz de generar las características observadas en el ALI. Verificamos que nuestro modelo cumpliera con 3 de 4 de los criterios propuestos por Matute-Bello ⁵⁹: 1) alteración de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar, 2) evidencia histológica del daño al tejido pulmonar, 3) presencia de infiltrado de neutrófilos y 4) disfunción fisiológica del pulmón.

La alteración de la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar se determinó por el incremento de la concentración de proteínas en el BAL. Esta concentración fue analizada después de 24 h de la administración del LPS. La administración de 50 µg y 100 µg de LPS indujo un incremento significativo de 1.5 y 1.9 veces respectivamente en la concentración de proteínas respecto a los ratones control (**Figura 10a**).

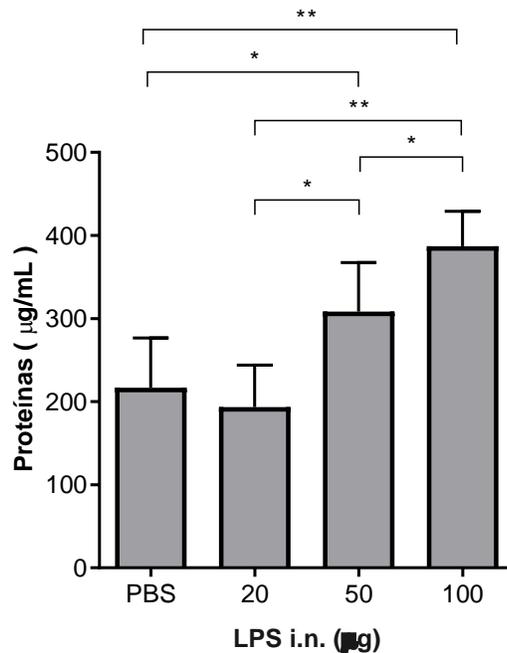


Figura 10. Aumento de la concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar.

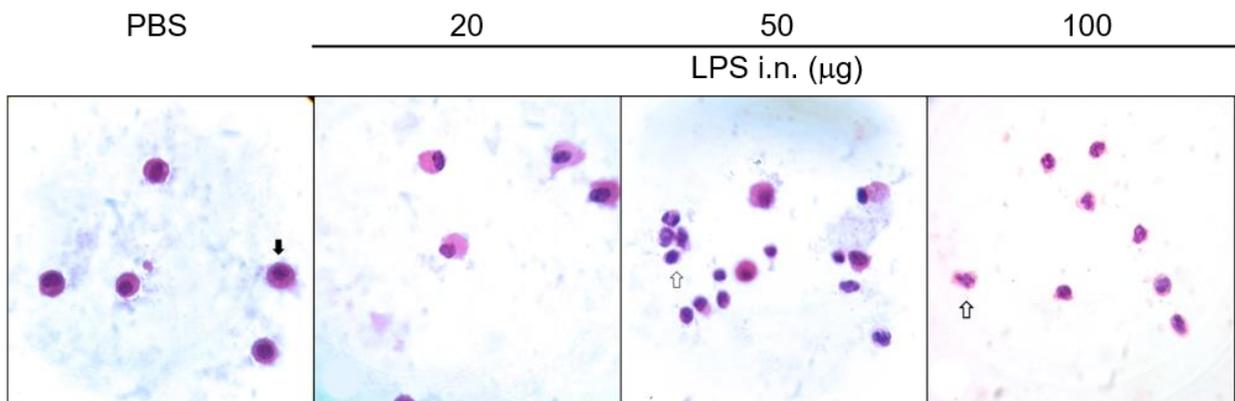
Efecto de la administración intranasal de LPS en la concentración de proteínas del BAL. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5). Diferencias verificadas mediante Kruskal-Wallis y Mann-Whitney: * p < 0.05, ** p < 0.01 comparados entre los tratamientos señalados.

Al analizar la celularidad del BAL, se observó que en los ratones control está conformada casi en su totalidad por macrófagos. El tratamiento con 20 µg, 50 µg y 100 µg de LPS indujo una

disminución del porcentaje de macrófagos en los ratones tratados respecto a los ratones no tratados y un incremento en el porcentaje de neutrófilos en los ratones tratados con respecto al control (**Figura 11**). El BAL de los ratones tratados con 50 μg y 100 μg estaba compuesto casi en su totalidad por neutrófilos.

Estos resultados sugieren que la administración de LPS incrementó de la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar causando un aumento de la concentración de proteínas y un infiltrado de neutrófilos al espacio alveolar.

a)



b)

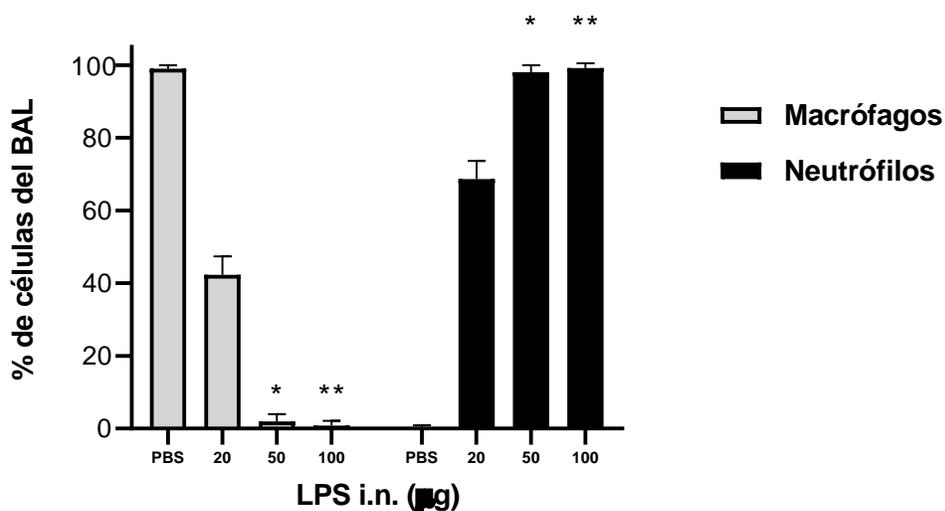


Figura 11. Aumento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar en modelo de ALI.

a) Micro fotografías de las células de BAL teñidas con hematoxilina y eosina (100x). Los macrófagos son células grandes de núcleo compacto con forma de frijol (flecha negra). Los neutrófilos son células más pequeñas que presentan un núcleo lobulado y citoplasma rosado (flecha blanca). b) Porcentaje de neutrófilos y macrófagos en el BAL determinados por cuenta diferencial y microscopia. Las imágenes son representativas de un experimento independiente. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n=5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con los ratones control.

A continuación, se realizó el análisis de cortes histológicos de tejido pulmonar. En ratones control se observó que la estructura de los espacios alveolares estaba conservada de acuerdo a lo reportado en la literatura (50 μm de diámetro aprox., 86), sin engrosamiento de los espacios intersticiales, con presencia de 1-2 macrófagos por cada 10 campos microscópicos analizados con el objetivo de 40x y con ausencia de infiltrado de neutrófilos (**Figura 12a**).

En los ratones tratados se observaron alteraciones progresivas en los espacios alveolares con incremento en el diámetro alveolar en la cercanía de los bronquios, con disrupciones francas en la mayoría de los espacios alveolares en los ratones tratados con 100 μg de LPS.

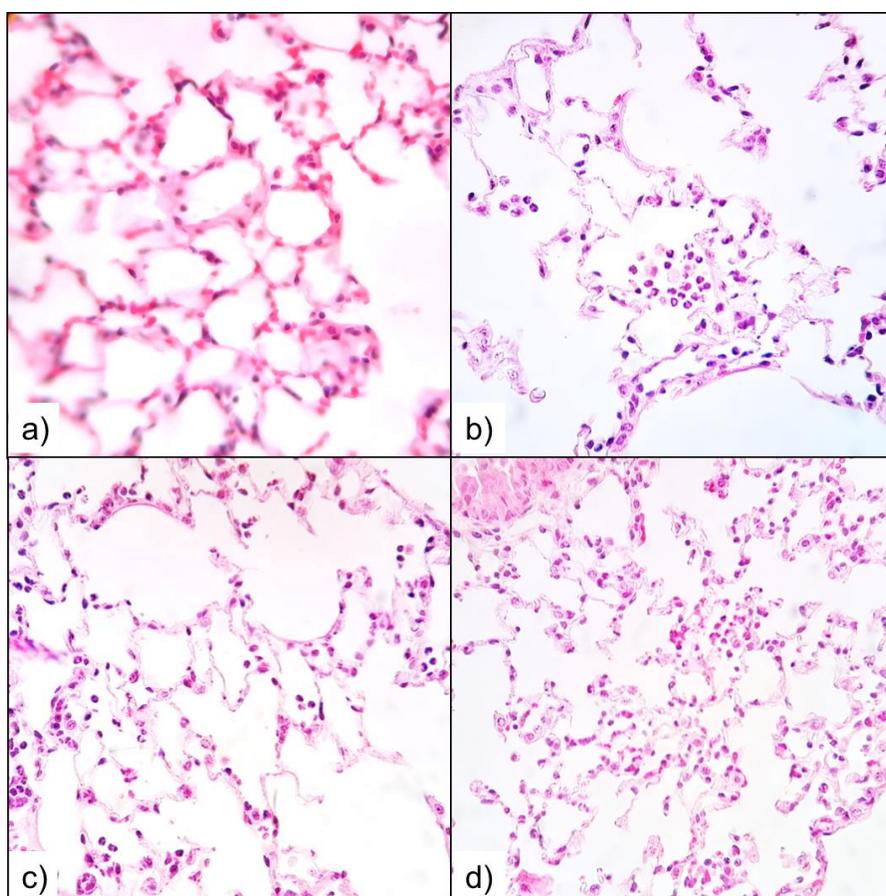


Figura 12. Infiltrado de neutrófilos y daño en tejido pulmonar en modelo de ALI.

Micro fotografías de cortes histológicos de pulmón teñidos con hematoxilina y eosina (40X) de a) ratones control; y ratones tratados con b) 20 μg , c) 50 μg y 100 μg LPS. En los tejidos tratados con LPS se observa una pérdida de la arquitectura alveolar y presencia de neutrófilos. Las imágenes son representativas de un experimento individual.

En los pulmones tratados con 20 μg se observó un infiltrado de neutrófilos distribuidos en los alveolos cercanos a los bronquios intra-pulmonares. Mientras que en los tratados con 50 μg

y 100 µg el infiltrado de neutrófilos se observó distribuido en todo el parénquima y en la mayoría de los espacios alveolares, además se observaron micro-hemorragias distribuidas en el parénquima pulmonar. Estos resultados indican que la administración de LPS genera daño tisular cuya severidad es dosis dependiente y demuestran la presencia del infiltrado de neutrófilos en el tejido pulmonar.

La citometría de flujo permite el análisis cualitativo y cuantitativo no-subjetivo del tipo de células infiltradas en el pulmón, por lo que se utilizó esta técnica para dicho análisis. La estrategia para la identificación y cuantificación de neutrófilos se muestra en la **Figura 13**. Entre los leucocitos totales (cél. CD45⁺) los neutrófilos fueron identificados por su expresión de Ly6G.

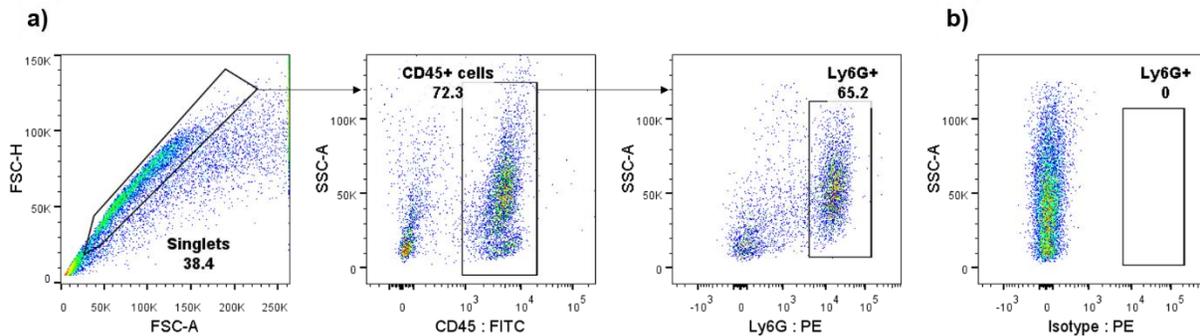


Figura 13. Estrategia de análisis por citometría de flujo de neutrófilos en tejido pulmonar.

a) A partir de los *singlets* fueron seleccionados los leucocitos totales (CD45⁺) y de estos se identificaron a los neutrófilos por la expresión del marcador Ly6G. b) Control de isotipo para el marcador Ly6G:PE.

La **Figura 14** muestra la presencia de neutrófilos en el tejido pulmonar de ratones control y tratados con LPS. Se observó un incremento significativo del porcentaje de neutrófilos (Ly6G⁺); 9.5% en los ratones control y aumentando a 45.8%, 57.0% y 59.0% respectivamente; este aumento fue significativo respecto al control y no se observaron diferencias entre los tratamientos (**Figura 15**).

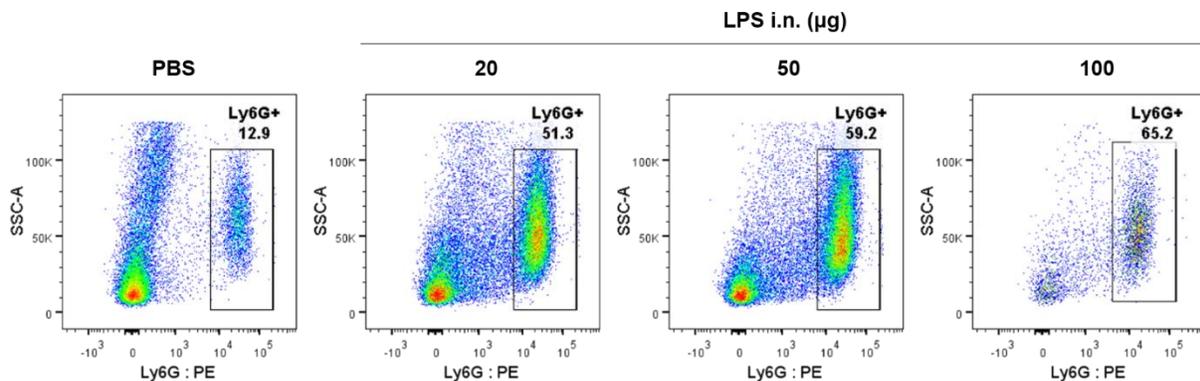


Figura 14. Infiltrado de neutrófilos en tejido pulmonar en el modelo de ALI mediante citometría de flujo.

Análisis del infiltrado de neutrófilos (CD45⁺Ly6G⁺) en tejido pulmonar que se realizó para cada condición de los experimentos independientes. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual.

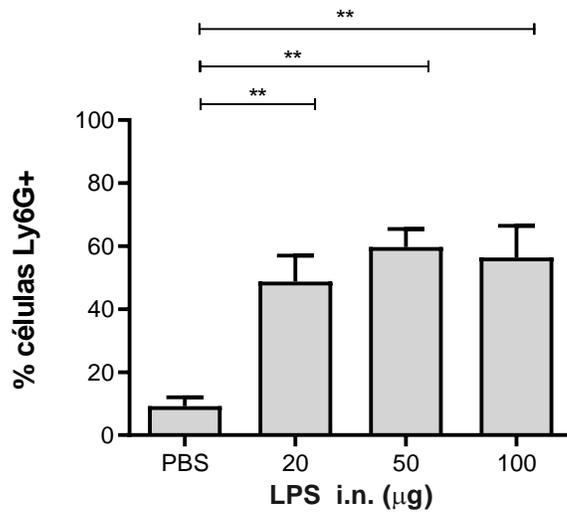


Figura 15. Análisis cuantitativo del infiltrado de neutrófilos en pulmón con ALI.

El porcentaje de neutrófilos es respecto a los leucocitos totales (CD45⁺). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=7). * p < 0.05, ** p < 0.01 comparados con los ratones control.

De acuerdo a los resultados presentados, la administración intranasal de 20 μ g, 50 μ g y 10 μ g de LPS en ratones C57BL/6 induce daño pulmonar agudo (ALI) puesto que se demostró el incremento la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, la generación de daño en el tejido pulmonar y un infiltrado inflamatorio de neutrófilos.

6.2. Distribución y fenotipo de subpoblaciones de linfocitos B

Una vez validado el modelo de ALI, se diseñó un panel para análisis por citometría de flujo que permitiera identificar las subpoblaciones de LB aislados a partir de pulmón. El panel fue validado utilizando esplenocitos; también se determinó la distribución de subpoblación de LB en células de cavidad pleural y cavidad peritoneal. A partir de los leucocitos viables definidos como CD45⁺ Zombie Aqua⁻ se identificaron los LB por la expresión del marcador CD19, y las subpoblaciones fueron diferenciadas mediante los marcadores CD5 y CD11b: B2 CD5⁻ CD11b⁻; B1-a CD5⁺ CD11b⁺ y B1-b CD5⁻ CD11b⁺. Esta estrategia de identificación de LB también se utilizó para las células de bazo, cavidad pleural y peritoneal (**Figura 16**).

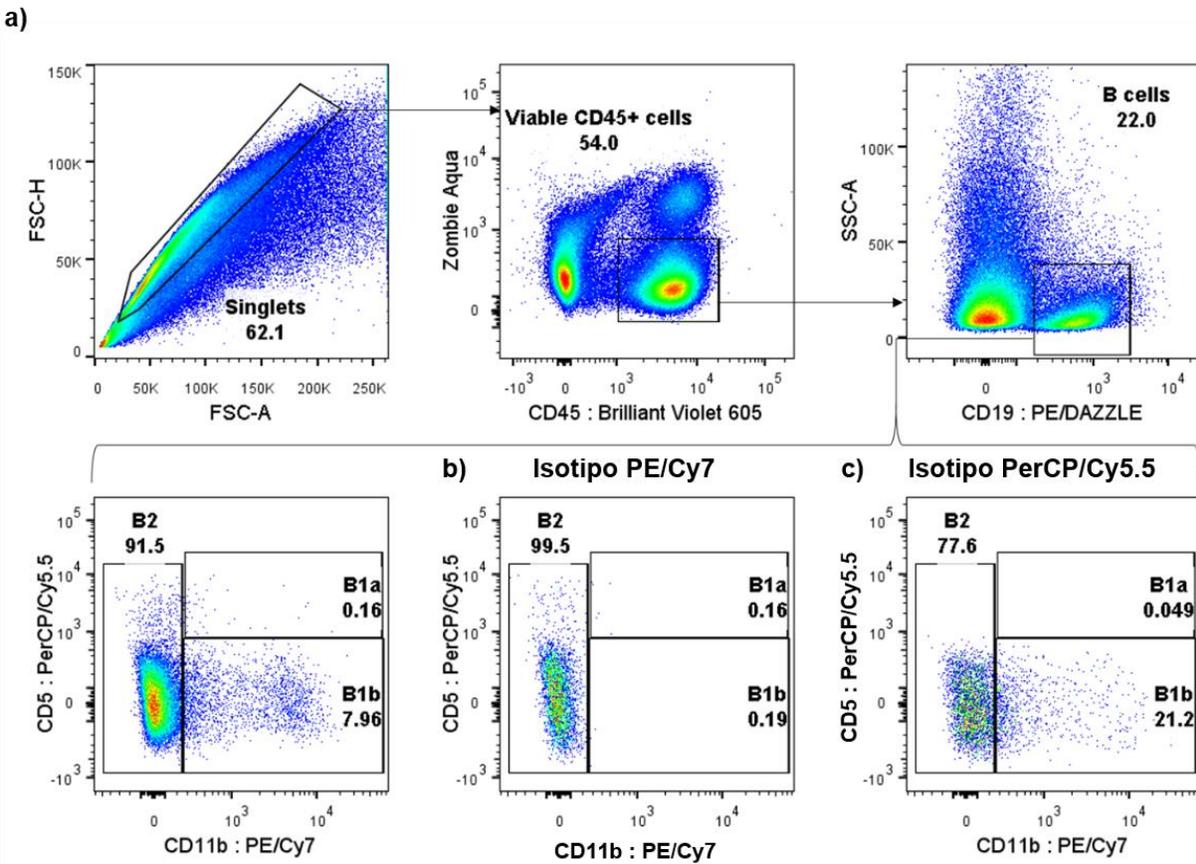


Figura 16. Estrategia de análisis para datos de citometría de flujo para identificar linfocitos B y subpoblaciones B2, B1-a y B1-b.

a) A partir de los *singlets* se seleccionaron los leucocitos totales viables (CD45⁺ Zombie Aqua⁻) y de estos se identificaron a los LB por la expresión del marcador CD19. De la población de células CD19⁺ se realizó un *dot plot* de la expresión de CD11b y CD5 para identificar las subpoblaciones B2, B1-a y B1-b. b) Control de isotipo para el marcador CD11b: PE/Cy7 y c) isotipo para el marcador CD5: PerCP/Cy5.5.

6.2.1. Análisis de linfocitos B y subpoblaciones en tejido pulmonar.

El análisis demostró que el porcentaje de LB (CD19⁺) en los pulmones de ratones control fue de 19.8% y que disminuyó con los tratamientos de LPS hasta 7.6%, 3.6% y 3.6% respectivamente (**Figura 17**). Esta disminución fue significativa para todas las dosis de LPS respecto al control y de las dosis de 50 µg y 100 µg respecto a 20 µg.

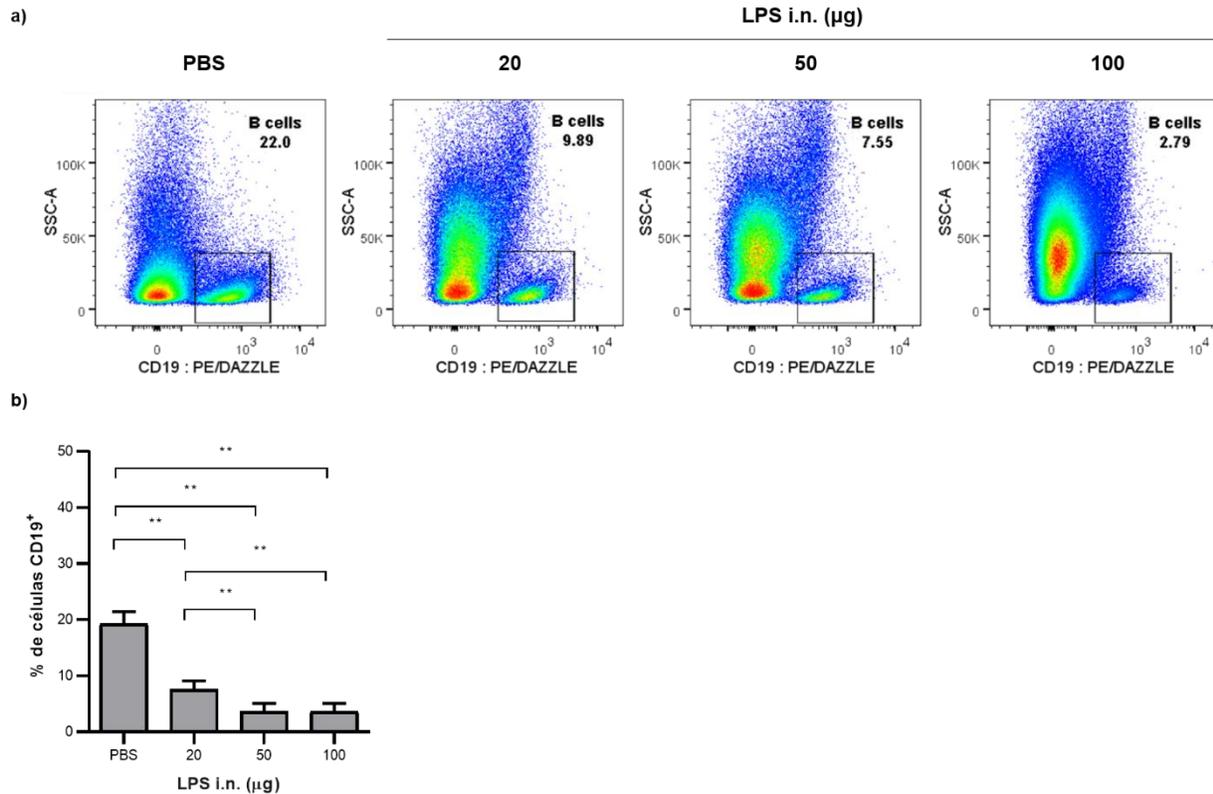


Figura 17. Disminución del porcentaje de linfocitos B totales en pulmón con ALI.

a) Poblaciones de LB (CD19⁺) en pulmón de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual. b) Porcentaje de LB respecto de leucocitos totales (CD45⁺) en pulmón. Los resultados se expresan como el promedio ± desviación estándar (n=5). ** p < 0.01 comparados entre los tratamientos señalados.

El análisis de las subpoblaciones de LB mostró que en los ratones control, la subpoblación B2 fue predominante con un 95.2%. Los LB B1 representaron en conjunto aproximadamente el 5.0 %: siendo B1-b el 4.2% y B1-a el 0.2%. Al observar detalladamente los *dot plots* de las subpoblaciones B1-b, se pudieron diferenciar dos que diferían en el nivel de expresión de CD11b, a estas se les denominó B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{hi} (**Figura 18a**). El porcentaje de estas fue 4.0% y 1.1% respectivamente.

La distribución de las subpoblaciones cambió con los tratamientos. El porcentaje de B2 se redujo hasta 84.8%, siendo significativa en los ratones tratados con 50 µg y 100 µg de LPS

respecto al control. También se observó un incremento en el porcentaje de las subpoblaciones B1-b: B1-b CD11b^{mid} hasta 9.2% y B1-b CD11b^{Hi} hasta 10.1%, sin embargo, este incremento solo fue significativo para B1-b CD11b^{Hi} en el tratamiento de 50 μ g (**Figura 18b**). El porcentaje de la subpoblación B1-a solo mostró un incremento a 2.0% en las dosis de 100 μ g.

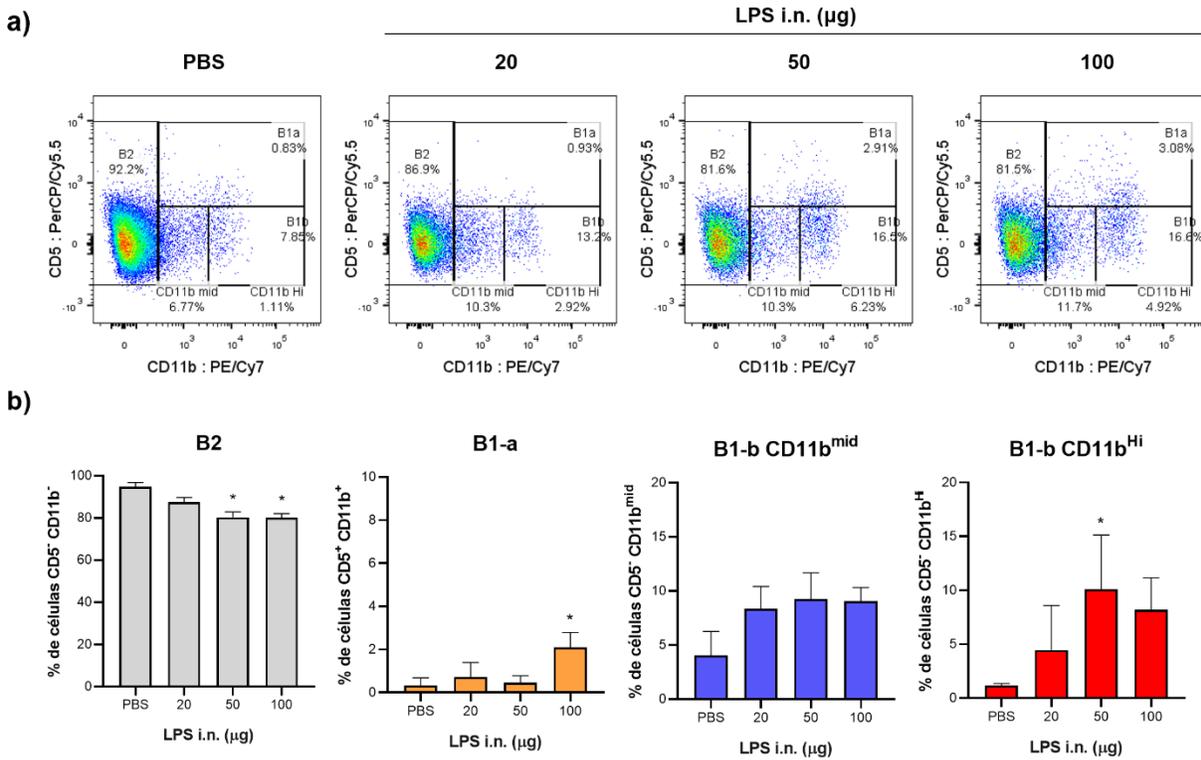
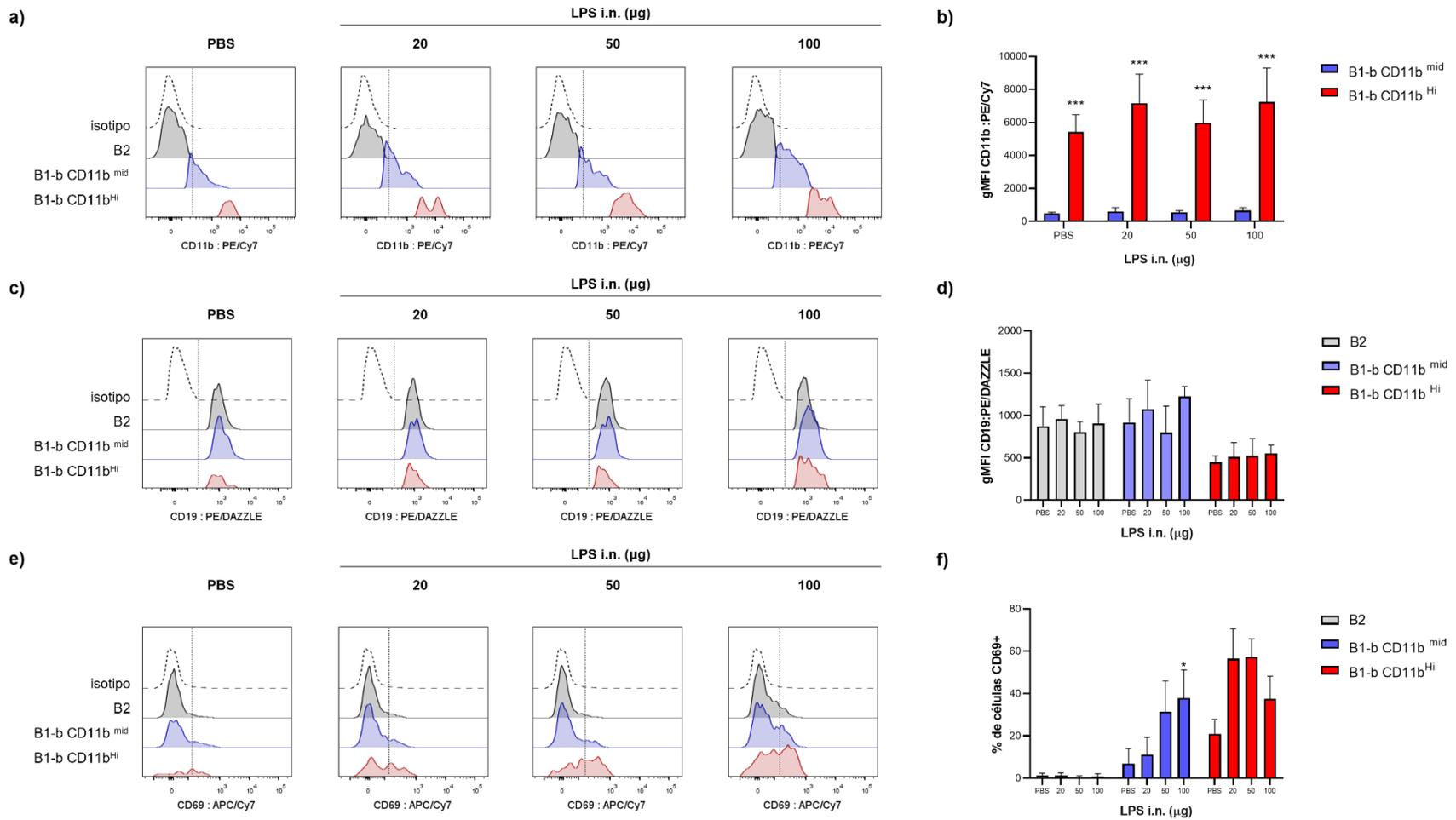


Figura 18. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en pulmón con ALI.

a) Cambios en el porcentaje de subpoblaciones de LB en pulmón de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual. b) Porcentaje de las subpoblaciones respecto a LB totales (CD19⁺) en pulmón. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5). * $p < 0.05$ * comparados con los ratones control.

Respecto a la diferencia de expresión de CD11b en las subpoblaciones B1-b, la intensidad media geométrica de fluorescencia (gMFI) de la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} fue 11.2 veces mayor a la de B1-b CD11b^{mid} (**Figura 19 a y b**).

Al verificar si la expresión de CD11b era el único parámetro en el que diferían ambas subpoblaciones, se observó que la expresión de CD19 era diferente entre las subpoblaciones. B2 y B1-b CD11b^{mid} mostraron una expresión similar de CD19, mientras que la expresión B1-b CD11b^{Hi} fue 1.8 veces mayor (**Figura 19 c y d**). No se observaron diferencias significativas en la gMFI de los marcadores CD11b y CD19 de cada subpoblación en los ratones tratados respecto a los ratones control.



Con el objetivo de verificar si los LB eran activados por las administraciones de LPS, también se analizó la expresión del marcador de activación CD69. En la subpoblación B2 no se observaron cambios significativos entre los tratamientos, el porcentaje de células CD69⁺ fue de 0.5% a 1.3% (**Figura 19 e y f**). En la subpoblación B1-b CD11b^{mid} se observó un 6.8% de células CD69⁺ en los ratones control y un aumento a 11.0%, 31.5% y 37.9% respectivamente en los diferentes tratamientos con LPS. Solo el tratamiento con 100 µg fue significativo. En la subpoblación B1-b CD11b^{Hi}, se observó un 20.8% de células CD69⁺ en los ratones control y un aumento a 56.5%, 57.3% y 37.4% respectivamente en los tratamientos con LPS. Los porcentajes observados en los tratamientos no fueron significativos.

A pesar de que se observan diferencias claras entre el porcentaje de células CD69⁺ entre las subpoblaciones, estas no fueron significativas. La razón puede deberse al número de experimentos realizados, a la cantidad limitada de células que pudieron ser obtenidas y cuantificadas de las subpoblaciones B1-a y B1-b mediante citometría de flujo y a la variabilidad propia de la técnica de aislamiento.

Se excluyó a la subpoblación B1-a del análisis de expresión de CD11b y CD19 y el porcentaje de células CD69⁺ (tanto en las células de pulmón, como en el resto de los órganos trabajados) debido a la escasa cantidad de células obtenidas y a la alta variabilidad de los datos obtenidos por citometría.

6.2.2. Análisis de linfocitos B y subpoblaciones en cavidad pleural.

El porcentaje de LB totales respecto a leucocitos totales fue de 46.8% a 33.3%; las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas por lo que la variación observada puede deberse a la técnica de lavado de la cavidad pleural (**Figura 22**).

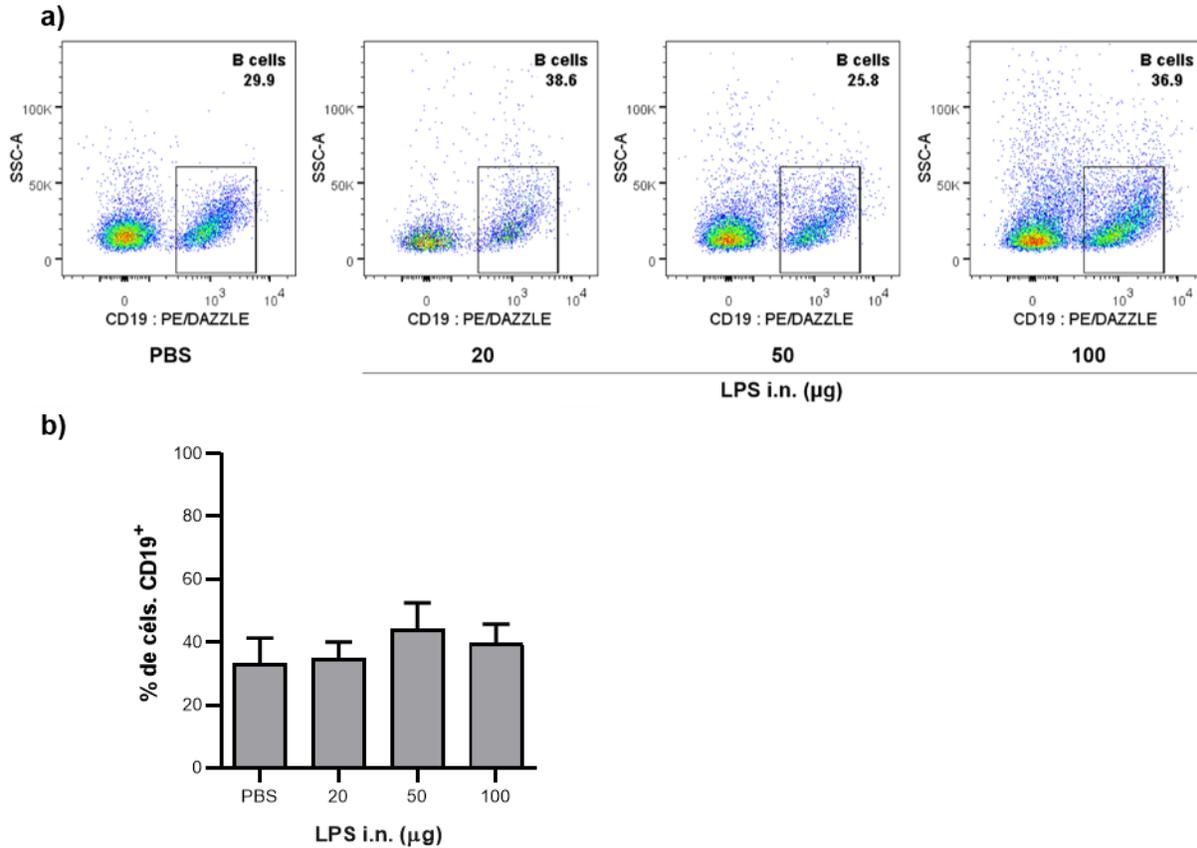


Figura 20. Porcentaje de linfocitos B en cavidad pleural de ratones con ALI.

a) Poblaciones de LB (CD19⁺) en cavidad pleural de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual. b) Porcentaje de LB respecto de leucocitos totales (CD45⁺) en cavidad pleural. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5).

El análisis de las subpoblaciones de LB mostró que en los ratones control, los B2 representan la subpoblación predominante con un porcentaje de 64.8% a 54.2%, seguidos de B1-b con un porcentaje de 40.1% a 31.1%. La subpoblación B1-a representó el 5.7% a 3.3%. De manera similar a lo observado con las células B1-b del pulmón, también pudieron identificarse las subpoblaciones B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{Hi} a partir de la cavidad pleural. Estas representaron el 39.3% a 30.3% y 2.8 a 0.8%, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de cada subpoblación entre los tratamientos (**Figura 21**).

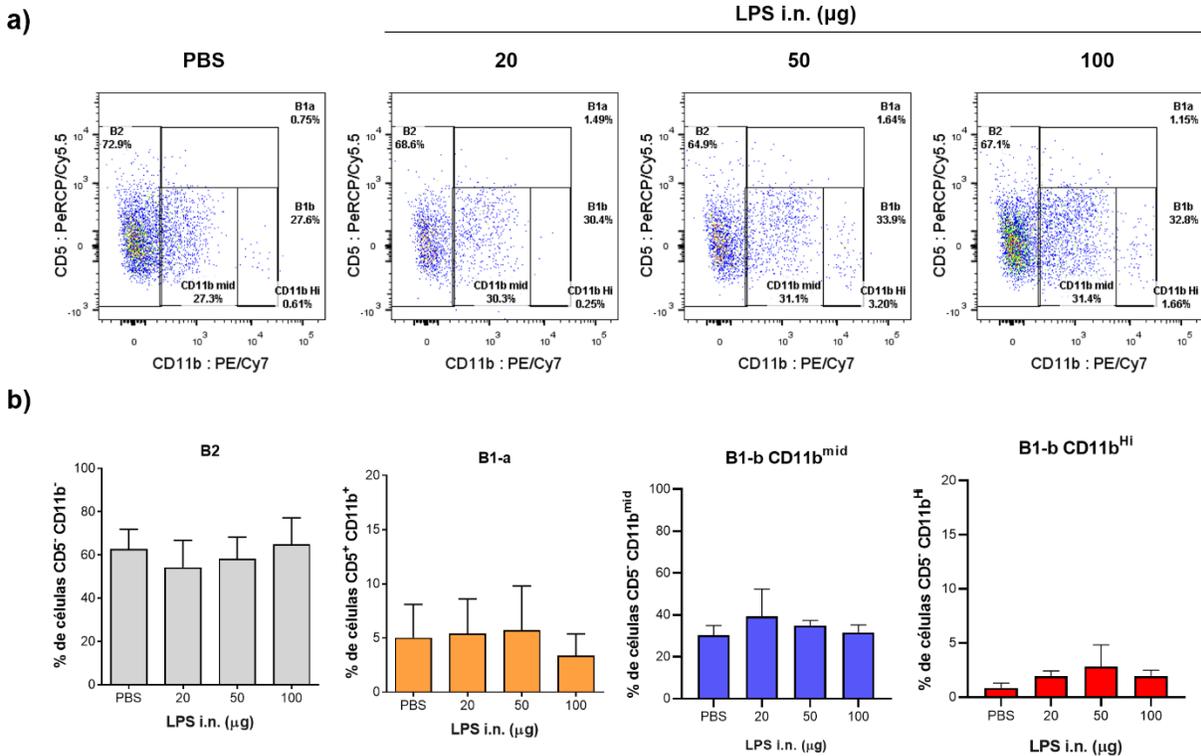


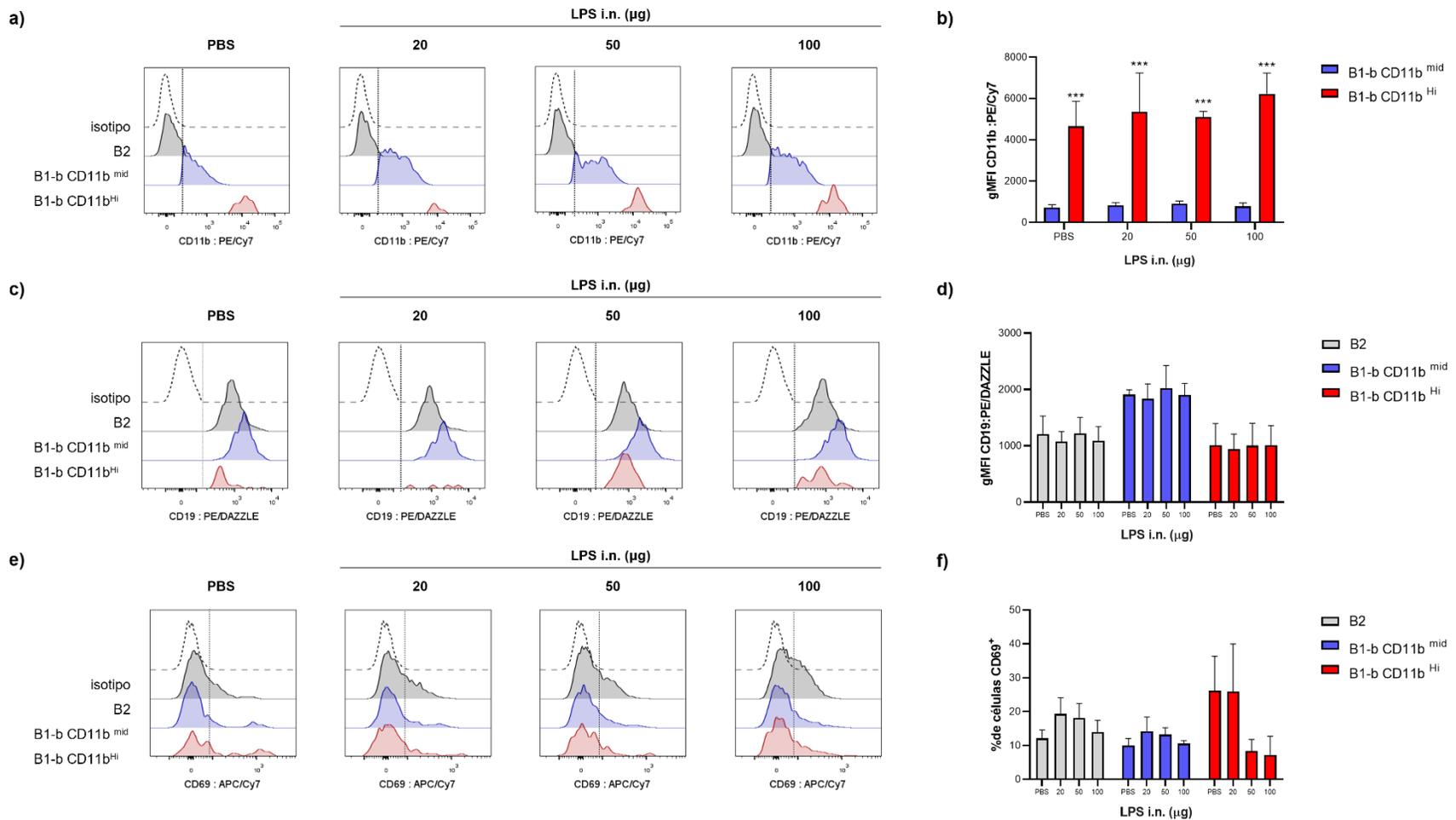
Figura 21. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en cavidad pleural en ratones con ALI.

a) Cambios en el porcentaje de subpoblaciones de LB en cavidad pleural de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de las subpoblaciones respecto a LB totales (CD19⁺) en cavidad pleural. Los dot plots son representativos de un experimento individual (n=5).

De la forma que fue analizada la expresión de los marcadores CD11b y CD19, y el porcentaje de células CD69⁺ en las subpoblaciones B2, B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{Hi} de pulmón, también se analizaron las células obtenidas de cavidad pleural, cavidad peritoneal y del bazo.

Respecto a la expresión de CD11b en las subpoblaciones B1-b, la gMFI de la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} fue 6.5 veces mayor a la de B1-b CD11b^{mid} (**Figura 22 a y b**).

La expresión de CD19 de las subpoblaciones fue diferente a lo observado en pulmón. B1-b CD11b^{mid} presentó una mayor gMFI de CD19 que las otras subpoblaciones: 1.7 veces mayor que B2 y 1.9 mayor que B1-b CD11b^{Hi} (**Figura 19 c y d**). A diferencia del pulmón, en cavidad pleural las subpoblaciones B2 y B1-b CD11b^{mid} tuvieron diferentes gMFI de CD19. No se observaron diferencias significativas en la gMFI de los marcadores CD11b y CD19 de cada subpoblación en los ratones tratados LPS respecto a los ratones control.



En la subpoblación B2, el porcentaje de células CD69⁺ fue de 12.1% en los ratones control y a pesar de que al administrar los tratamientos de LPS este porcentaje se incrementó a 19.3%, 18.13% y 13.9% respectivamente, estos no fueron significativos (**Figura 22 e y f**). Una situación similar se observó con la subpoblación B1-b CD11b^{mid}, en la que el porcentaje fue de 9.9% en ratones control y se incrementó con los tratamientos a 14.1%, 13.2% y 10.5% respectivamente. Estos tampoco fueron significativos. Finalmente, en la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} se observó que el porcentaje fue mayor que en las otras subpoblaciones, siendo de 26.1% en los ratones control. Sin embargo, en los tratamientos con LPS este porcentaje disminuyó a 20.9%, 8.3% y 7.1% respectivamente. A pesar de que se observó una tendencia de disminución, la variabilidad de las determinaciones en los ratones control y en los tratados con 20 µg de LPS, estos cambios no fueron significativos.

6.2.3. Análisis de linfocitos B y subpoblaciones en cavidad peritoneal.

El porcentaje de LB respecto a leucocitos totales fue del 17.0% a 19.8%, no presentando cambios en los tratamientos respecto a los ratones control (**Figura 23**).

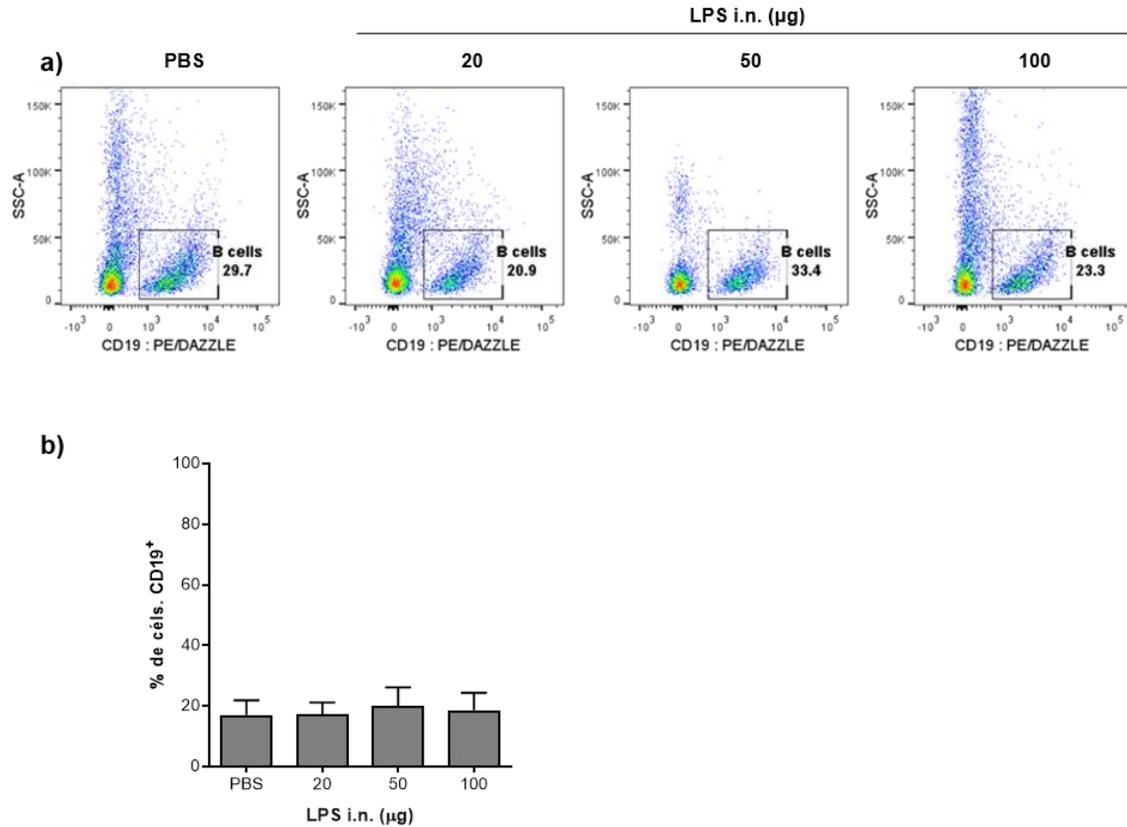


Figura 23. Porcentaje de linfocitos B en cavidad peritoneal de ratones con ALI.

a) Poblaciones de LB (CD19⁺) en cavidad peritoneal de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de LB respecto de leucocitos totales (CD45⁺) en cavidad pleural. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual (n=5).

La distribución de las subpoblaciones en cavidad peritoneal fue diferente a la observada en pulmón y cavidad pleural. Esta distribución no cambio significativa al administrar los tratamientos respecto a los organismos control. La subpoblación B2 fue la principal, representando 50.4% a 62.6%; el porcentaje de la subpoblación B1-b CD11b^{mid} fue 21.3% a 33.1% y el de B1-b CD11b^{Hi} fue 4.2% a 1.8%. El porcentaje de la subpoblación B1-a fue 4.7% a 2.0% (**Figura 24**). Es importante volver a mencionar que la variación observada puede deberse a la técnica del lavado de cavidad peritoneal y a la cantidad escasa de células colectadas respecto a pulmón.

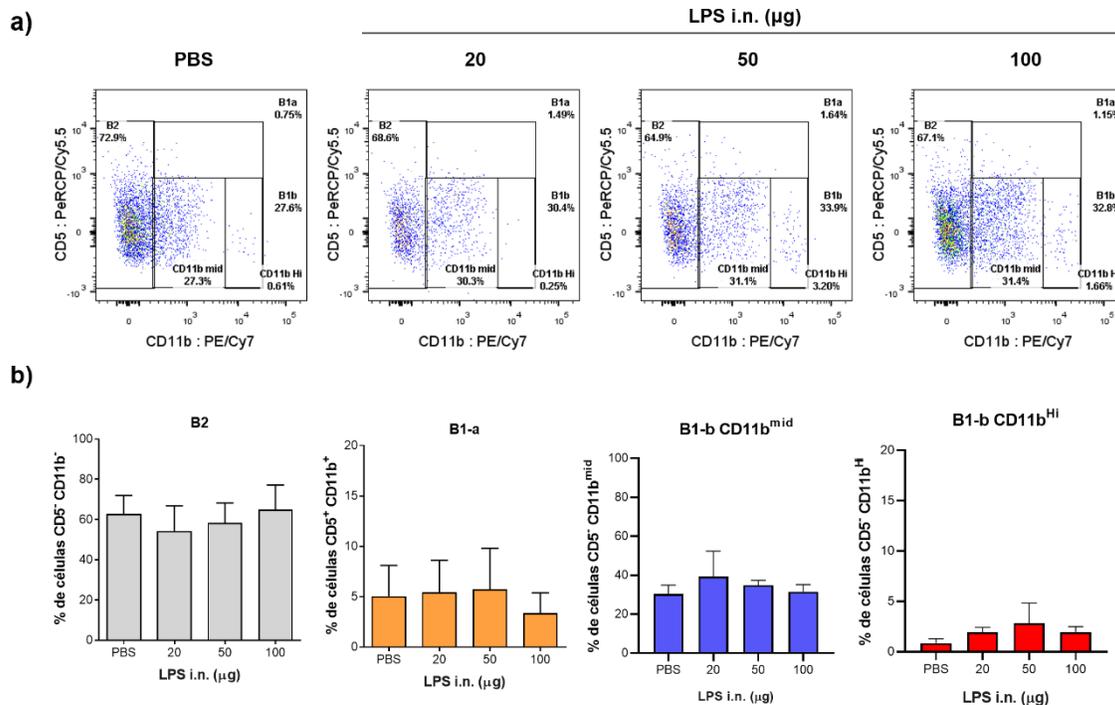


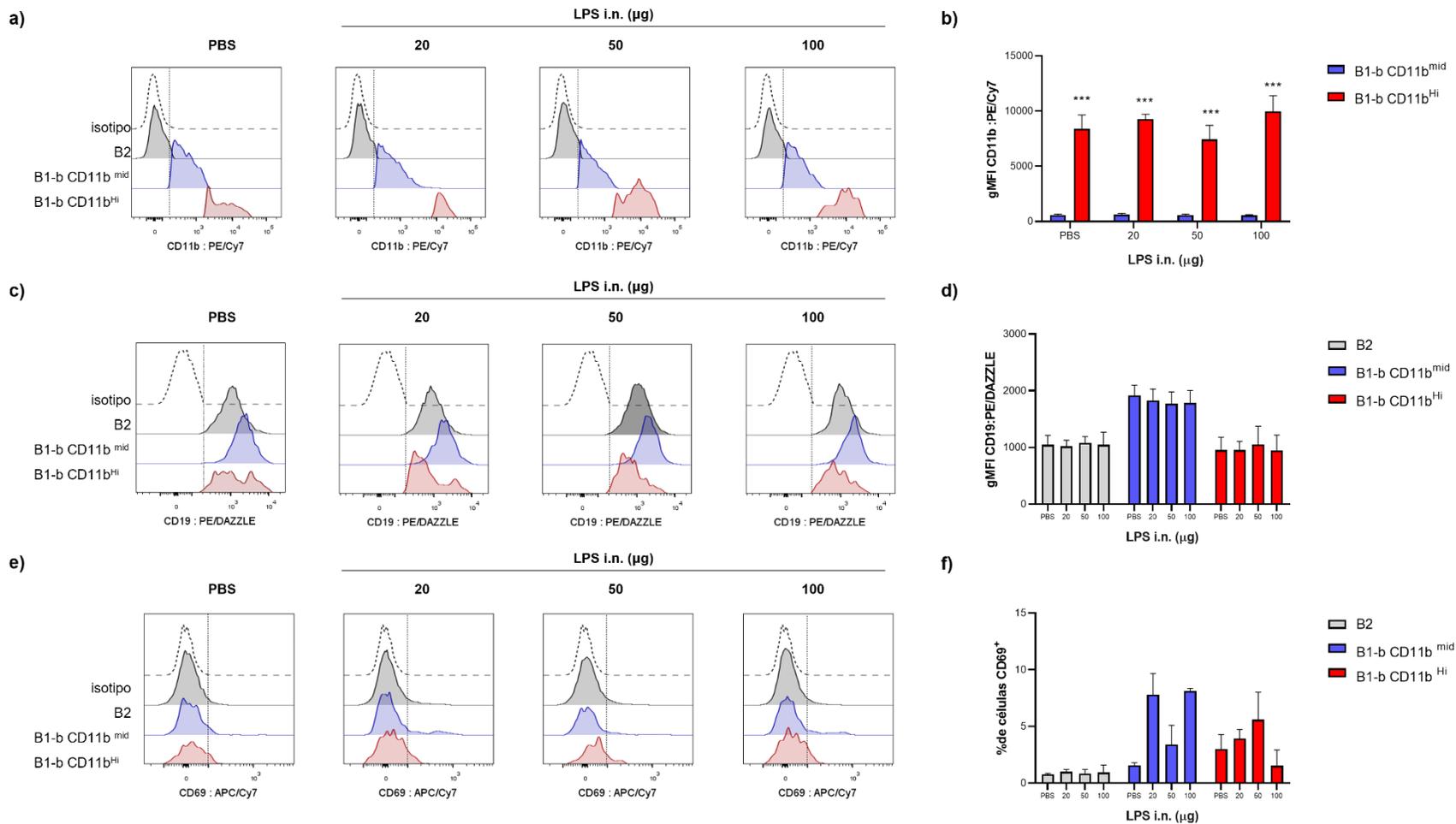
Figura 24. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en cavidad peritoneal de ratones con ALI.

a) Cambios en el porcentaje de subpoblaciones de LB en pulmón de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Puede observarse un aumento de B1b en los tratamientos con LPS, y dos subpoblaciones con diferente expresión de CD11b. b) Porcentaje de las subpoblaciones respecto a LB totales (CD19⁺) en cavidad peritoneal. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual (n=5).

Al analizar la expresión de CD11b en las subpoblaciones B1-b, la gMFI de la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} fue 15 veces mayor a la de B1-b CD11b^{mid} (**Figura 25 a y b**).

Respecto a la expresión de CD19, la gMFI de la subpoblación B1-b CD11b^{mid} fue 1.7 y 1.8 veces mayor que las de B2 y B1-b CD11b^{Hi}. Este patrón de expresión fue similar al observado en las subpoblaciones residentes de pulmón. Tampoco se observaron diferencias significativas en la gMFI de los marcadores CD11b y CD19 de cada subpoblación en los ratones tratados respecto a los ratones control (**Figura 25 c y d**).

En la subpoblación B2, el porcentaje de células CD69⁺ no se alteró en los tratamientos respecto a los ratones control, este porcentaje fue de 1.0% a 0.7%. Sin embargo, se observó un comportamiento diferente en las subpoblaciones B1-b. El porcentaje de células CD69⁺ de B1-b CD11b^{mid} en ratones control fue de 1.5%. Al administrar los tratamientos con LPS este porcentaje cambio a 7.8%, 3.4% y 8.1% al administrar 20 µg, 50 µg y 100 µg de LPS respectivamente. El porcentaje de células CD69⁺ en B1-b CD11b^{Hi} en ratones control fue de 3.0% y aumentando con los tratamientos a 3.9%, 5.6% y 1.5% al administrar 20 µg, 50 µg y 100 µg de LPS respectivamente (**Figura 25 e y f**).



Ninguna de las alteraciones observadas en el porcentaje de células CD69⁺ de la subpoblación B1-b fue significativa.

6.2.4. Análisis de linfocitos B y subpoblaciones en bazo.

El porcentaje de LB respecto a leucocitos totales fue de 23.3% a 24.7% y no se observaron cambios al administrar los tratamientos (Figura 26).

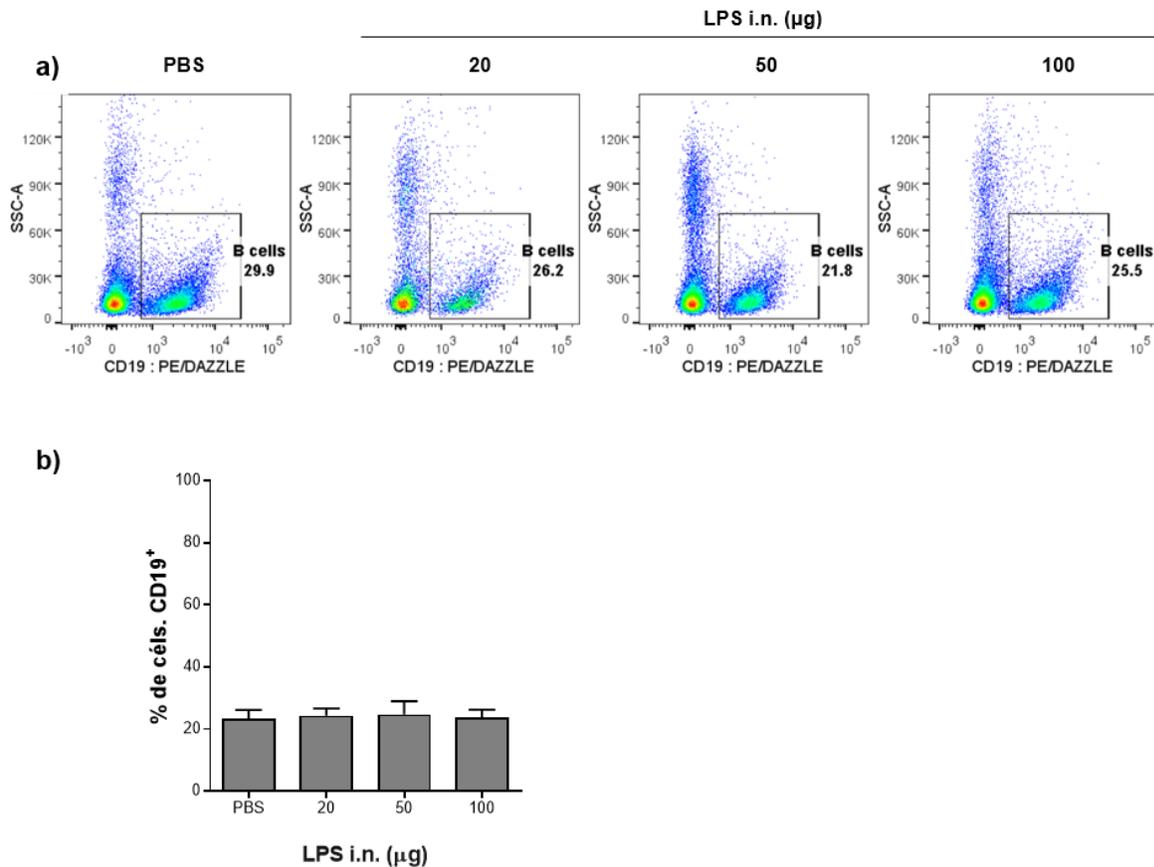


Figura 26. Porcentaje de linfocitos B en bazo de ratones con ALI.

a) Poblaciones de LB (CD19⁺) en bazo de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de LB respecto de leucocitos totales (CD45⁺) en cavidad pleural. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual (n=5).

La distribución de las subpoblaciones de LB no se alteró significativamente respecto a los organismos control. La principal fue B2 con un porcentaje de 92.2% a 88.8%. Los porcentajes de las subpoblaciones B1 fueron: B1-b CD11b^{mid} con 5.4% a 11.3%, B1-b CD11b^{Hi} con 0.8% a 1.9% y B1-a con 1.6% a 1.9%. (Figura 27).

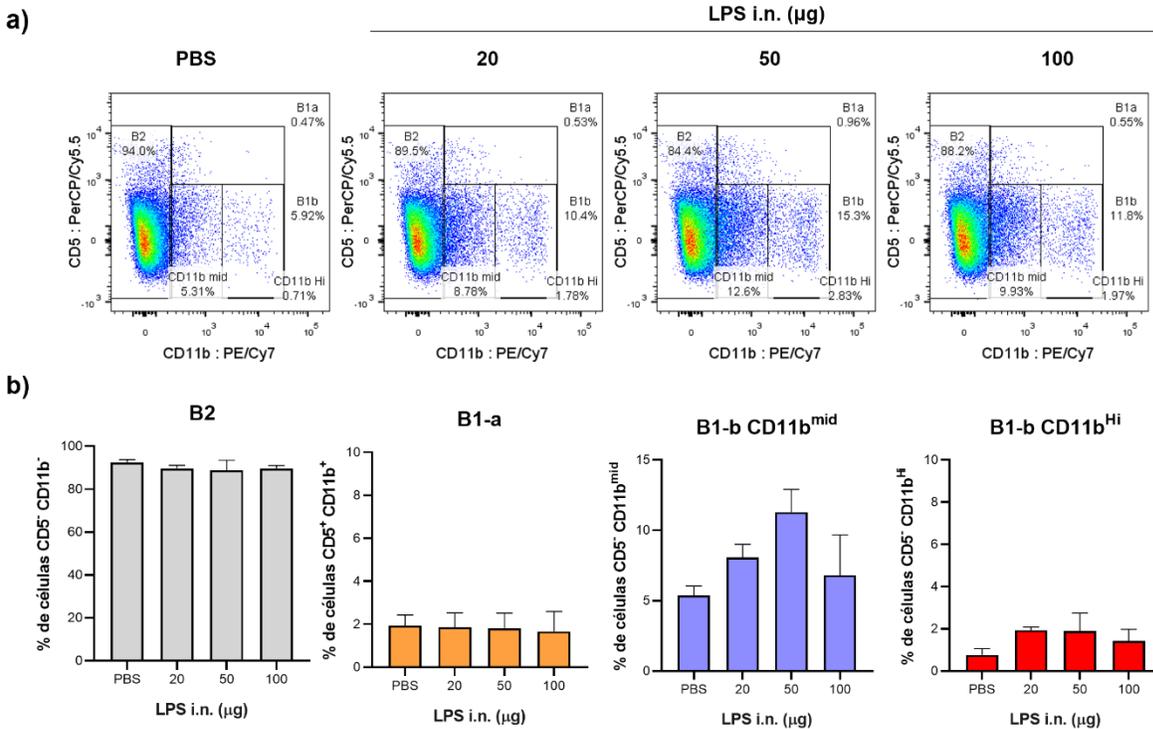


Figura 27. Distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en bazo de ratones con ALI.

a) Cambios en el porcentaje de subpoblaciones de LB en bazo de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de las subpoblaciones respecto a LB totales (CD19⁺) en bazo. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual (n=5).

La expresión de CD11b la gMFI de la subpoblación B1-b CD11b^{mid} fue 11.1 veces mayor que la de B1-b CD11b^{Hi} (Figura 28 a y b).

Respecto al marcador CD19 las diferencias de la expresión entre las subpoblaciones estudiadas fue diferentes a la observada en los otros órganos. Si bien la subpoblación B1-b CD11b^{mid} presentó una gMFI mayor que las otras, esta diferencia no fue tan pronunciada: 1.3 veces mayor que la de B2 y 1.5 veces mayor que B1-b CD11b^{Hi}. No se observaron diferencias significativas en la gMFI de los marcadores CD11b y CD19 de cada subpoblación en los ratones tratados respecto a los ratones control (Figura 28 c y d).

Al analizar el porcentaje de células CD69⁺ en las subpoblaciones, no se observaron cambios significativos en el porcentaje en los tratamientos respecto al organismos control, salvo en la variación de los porcentajes entre las subpoblaciones. El porcentaje de CD69⁺ de la subpoblación B2 fue 1.8% a 1.4%, en B1-b CD11b^{mid} fue 12.1% a 8.7% y en B1-b CD11b^{Hi} fue 24.3% a 13.3% (Figura 28 e y f). Las diferencias de porcentajes de CD69⁺ entre las subpoblaciones no fueron significativas.

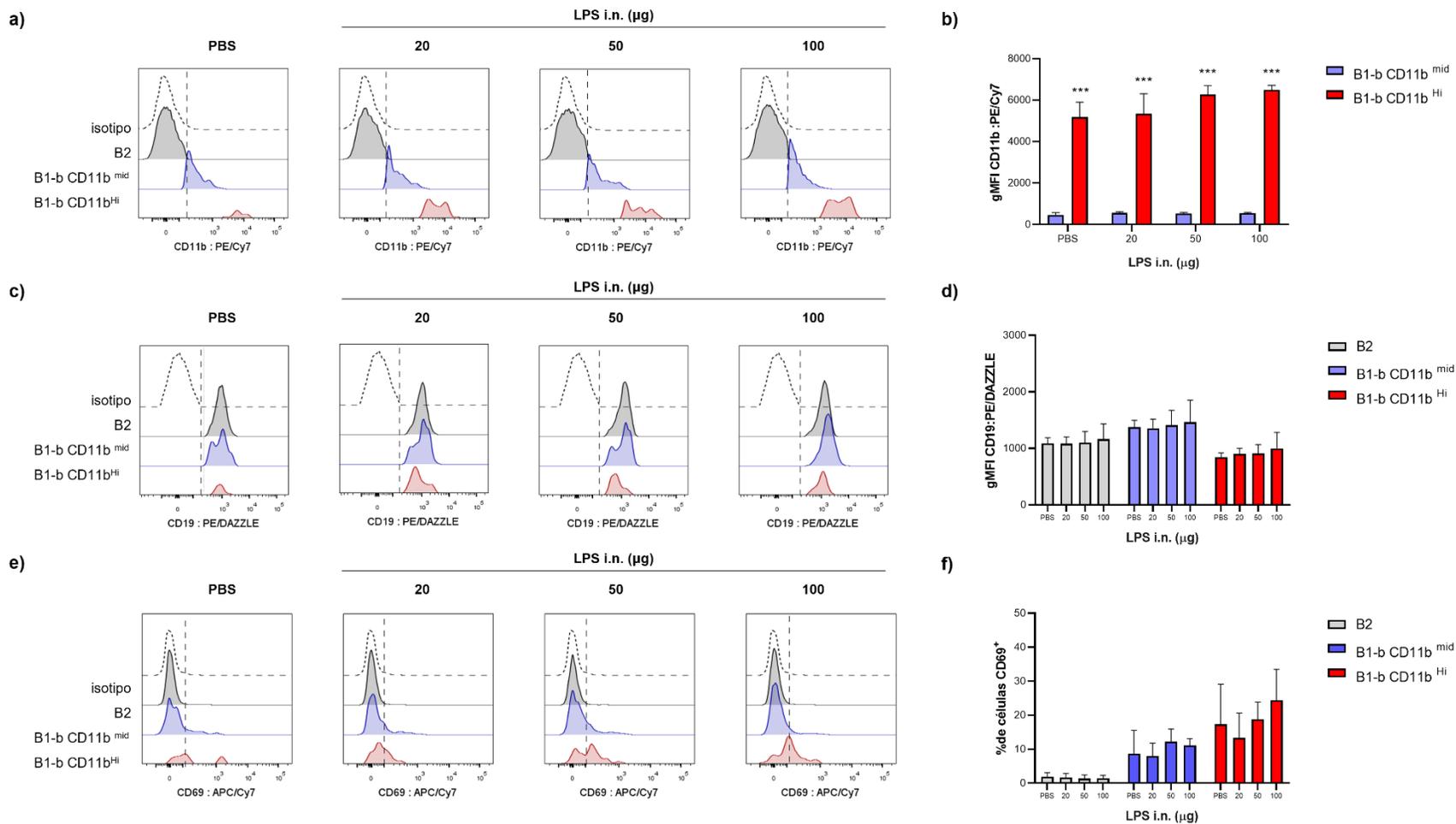
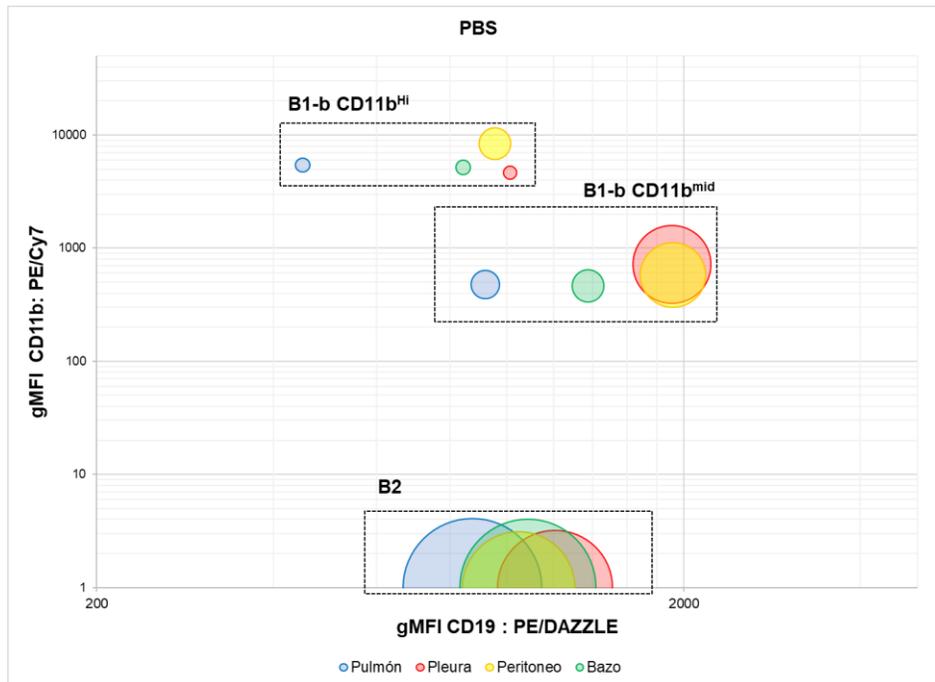


Figura 28. Expresión de los marcadores CD11b y CD19 y porcentaje de células CD69⁺ en las subpoblaciones de linfocitos B en bazo de ratones con ALI. a) Histogramas de expresión de CD11b y b) gráficas de la intensidad media geométrica de fluorescencia (gMFI) de CD11b en las subpoblaciones B1-b. c) Histogramas de expresión de CD19 y d) gráficas de la gMFI de CD19 en las subpoblaciones B2 y B1-b. e) Histogramas de expresión de CD69 y f) porcentaje de células CD69⁺ de las subpoblaciones B2 y B1-b. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5). *** p < 0.001 respecto a la subpoblación B1-b CD11b^{mid}.

En resumen, se observó que la distribución de las subpoblaciones B2, B1-b y B1-a en el pulmón se ve alterada durante el desarrollo del ALI, particularmente aumentando el porcentaje de B1-b respecto de los LB totales de 4.2% hasta un 16.5% a la dosis de 100 µg de LPS. Sumado a esto, se observó un aumento de la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} respecto a los LB totales, desde 1.1% hasta 10.1%, siendo a la dosis de 50 µg y 100 µg en las que se observó un mayor porcentaje de células CD69+ en pulmón.

También es importante mencionar que las subpoblaciones guardan un fenotipo característico en cada órgano del que fueron aisladas. La subpoblación B1-b CD11b^{Hi} expresa entre 6.5 y 15 veces más CD11b que B1-b CD11b^{mid} en los diferentes órganos, siendo en las cavidades pleural y peritoneal en las que mayor expresión se observó. Así mismo la subpoblación B1-b CD11b^{mid} presenta de 1.6 a 2-0 veces mayor expresión de CD19 que B1-b CD11b^{Hi}. Es importante mencionar que la expresión de CD19 en ambas subpoblaciones B1-b fue menor en el pulmón que en el resto de los sitios anatómicos estudiados. Estas observaciones se resumen de manera gráfica en la **Figura 29**, presentando los datos de los organismos control y de la dosis de 100 µg de LPS en la que se observó el ALI más severo.

a)



b)

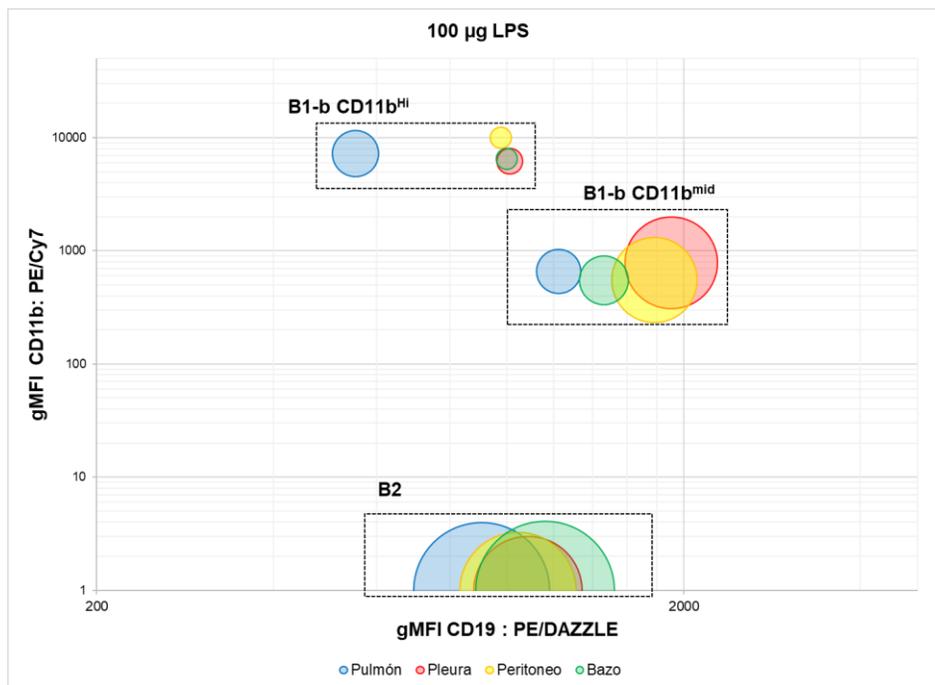


Figura 29. Fenotipo de las subpoblaciones B2, B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{Hi} en los órganos estudiados en el modelo de ALI.

Las gráficas representan la expresión de los marcadores CD11b y CD19 (expresada como el promedio de gMFI) de cada subpoblación en a) los organismos control y b) los organismos tratados con 100 g de LPS. El tamaño de los círculos que representan cada subpoblación está en proporción al porcentaje de cada subpoblación en cada órgano. Con el propósito de facilitar la presentación de los datos se asignó un valor de 1 a la expresión de CD11b de la subpoblación B2 (CD11b⁻). Realizado en Microsoft Excel.

6.3. Distribución y fenotipo de subpoblaciones de células NK

Para analizar las células NK, se diseñó un panel para análisis por citometría de flujo colaboradores^{53,54}. El panel se validó utilizando células de bazo, dada la abundancia de células NK en este órgano (**Figura 30**). A partir de los leucocitos viables (CD45⁺ Zombie Aqua⁺) se identificaron las células NK por la expresión del marcador NK1.1 y ausencia de expresión de CD3. Los estadios de maduración de las células NK se identificaron mediante los marcadores CD11b y CD27: doble negativos (DN, CD27⁻ CD11b⁻), CD11b^{lo} (CD27⁺ CD11b^{low}), doble positivos (DP, CD27⁺ CD11b⁺) y CD27^{lo} (CD27^{low} CD11b⁺).

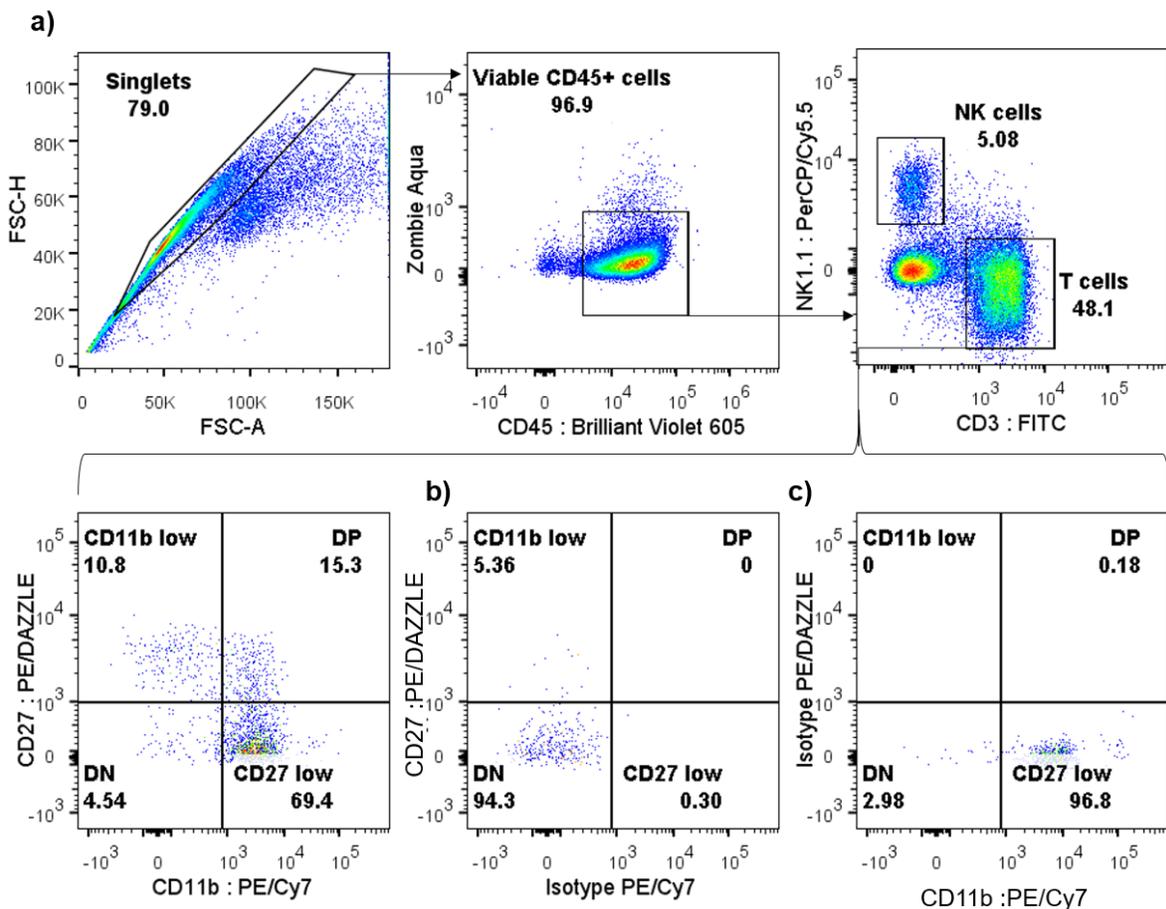


Figura 30. Estrategia para de análisis por citometría de flujo para identificación de células NK y sus estadios de maduración.

a) A partir de los *singlets* se seleccionaron los leucocitos totales viables (CD45⁺ Zombie Aqua⁺) y de estos se identificaron a las células NK por la expresión del marcador NK1.1 y por la ausencia de expresión de CD3 (NK1.1⁺ CD3⁻). De la población de células NK se realizó un *dot plot* de la expresión de CD11b y CD27 para identificar los estadios de maduración. b) Control de isotipo para el marcador CD11b: PE/Cy7 e c) isotipo para el marcador CD5: PerCP/Cy5.5.

6.3.1. Análisis de células NK y estadios de maduración en tejido pulmonar.

Las células NK representan el 12.5% del total de leucocitos CD45⁺ aislados de pulmón en ratones control. Al administrar LPS, se observó una disminución en el porcentaje de células NK, sin embargo solo fue significativo en los ratones tratados con 50 µg y 100 µg de LPS, en los que representaron el 7.6% y 4.3%, respectivamente (**Figura 31**).

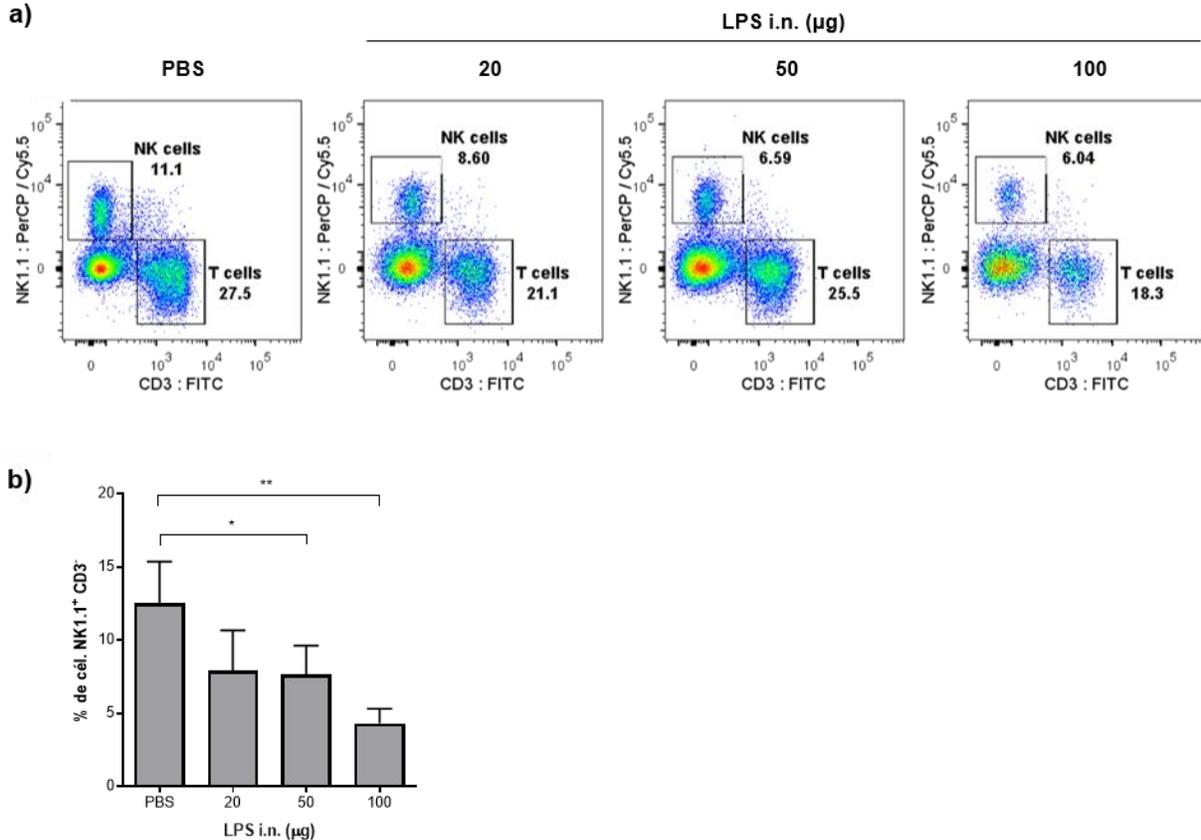


Figura 31. Disminución del porcentaje de células NK totales en pulmón con ALI.

a) Poblaciones de células NK (CD3⁻ NK1.1⁺) en pulmón de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de células NK respecto a leucocitos totales en pulmón. Los dot plots son representativos de un experimento individual (n=5). Resultados significativos * p<0.05, ** p < 0.01.

Se observó que en la mayoría de las células NK en pulmón de los ratones control se encuentran en los estadios maduros o de mayor diferenciación, 83.9% en el CD27^{low} y 3.9% en el DP. El porcentaje de DP aumentó progresiva y significativamente con las dosis de LPS hasta un 9.9%. Probablemente el aumento en este porcentaje no se haya visto reflejado en el porcentaje de otros estadios debido al número de células NK presentes en pulmón y el porcentaje de cada estadio de maduración (**Figura 32**). El estadio CD11b^{low} representó 1.3% a 1.7% y este porcentaje no se alteró con los tratamientos. Las células NK DN representaron el 13.6% en los ratones control y solo se observó una disminución significativa al 8.0% en el tratamiento con 50 µg; pero no hubo alteración al porcentaje de DN en los tratamientos con 20 µg y 100 de µg LPS.

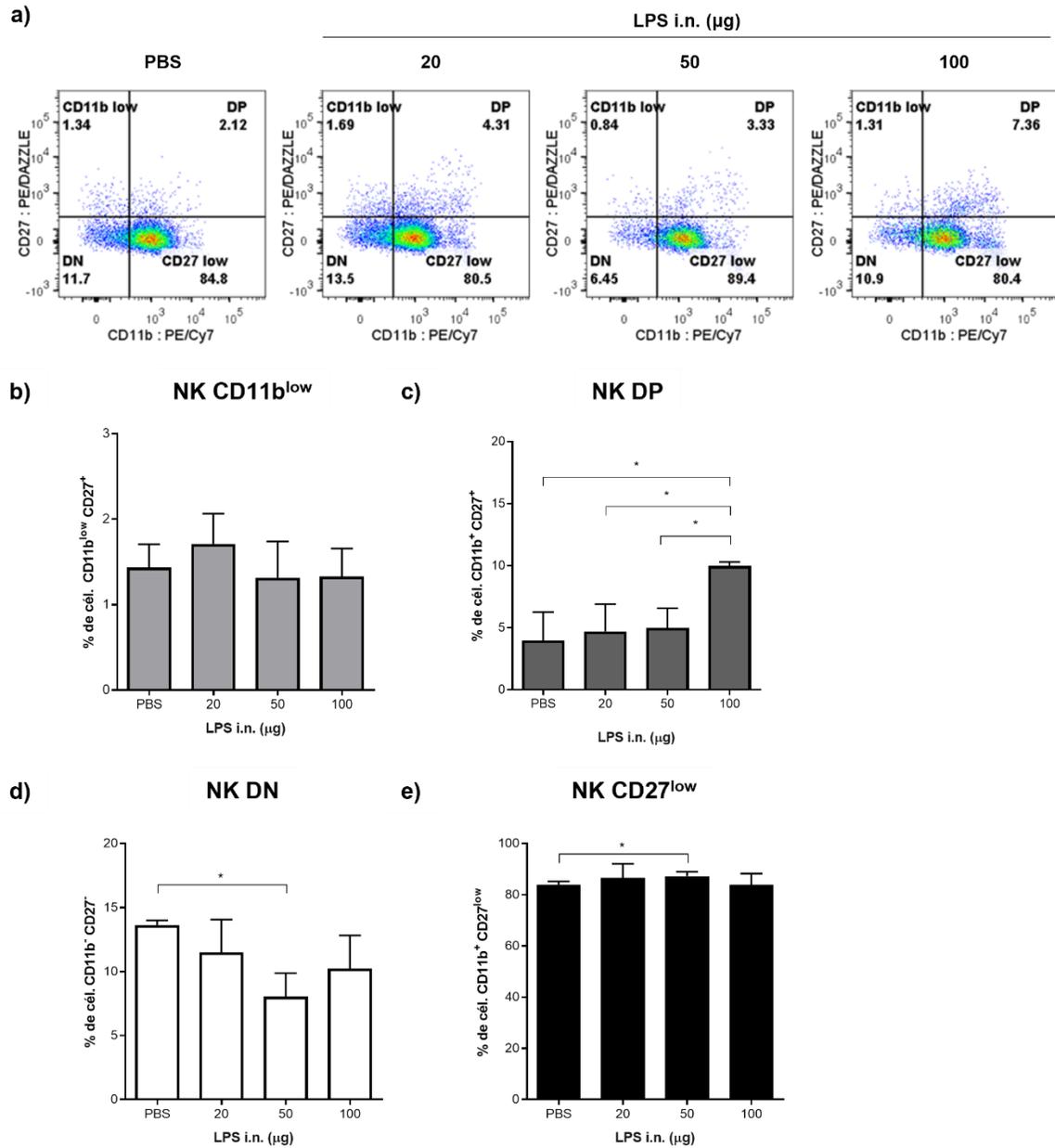


Figura 32. Distribución de estadios de maduración de células NK en pulmón con ALI.

a) Distribución de los estadios de maduración de células NK en pulmón de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de células DN (CD11b⁻ CD27⁻), c) CD11b^{low} (CD11b^{low} CD27⁻), d) DP (CD11b⁺ CD27⁺) y e) CD27^{low} (CD11b⁺ CD27^{low}) en pulmón. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual (n=5). Resultados significativos * p< 0.05.

6.3.2. Análisis de células NK y estadios de maduración en cavidad pleural.

Si bien no ha sido reportado que las cavidades serosas sean un reservorio importante de células NK en el ratón, nosotros identificamos esta población en los lavados de cavidad pleural. Las células NK totales representaron el 1.9% a 1.4% del total de leucocitos (**Figura 33**).

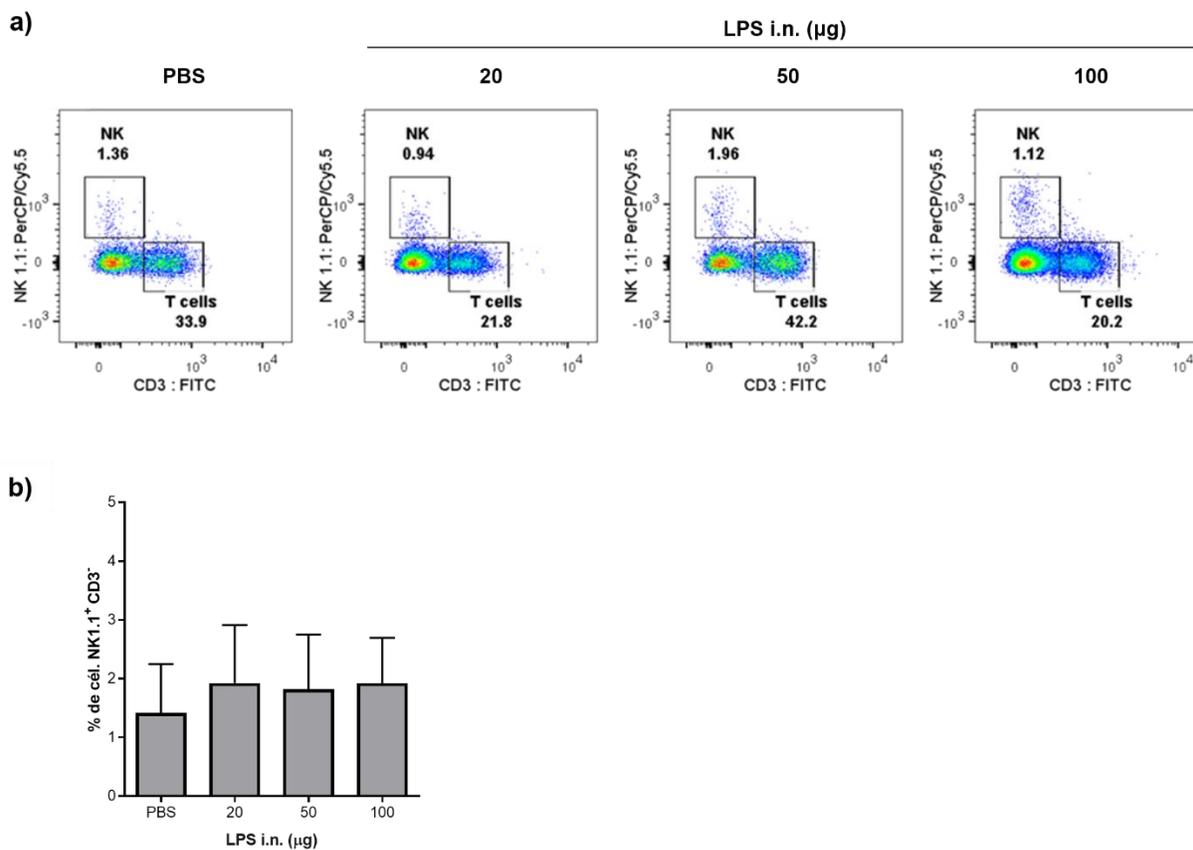


Figura 33. Porcentaje de células NK en cavidad pleural con ALI.

a) Poblaciones de células NK ($CD3^- NK1.1^+$) en cavidad pleural de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de células NK respecto a leucocitos totales en cavidad pleural. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual ($n=5$).

La mayoría de las células NK se encontraba en los estadios $CD27^{lo}$ y DP con un porcentaje de 47.6% a 51.3% y 38.5% a 40.9%, respectivamente. Los estadios DN y $CD11b^{lo}$ representaron los porcentajes menores (5.7% a 7.2% y 11.2% a 20.1%). Esta distribución de estadios no varió significativamente durante los tratamientos (**Figura 34**).

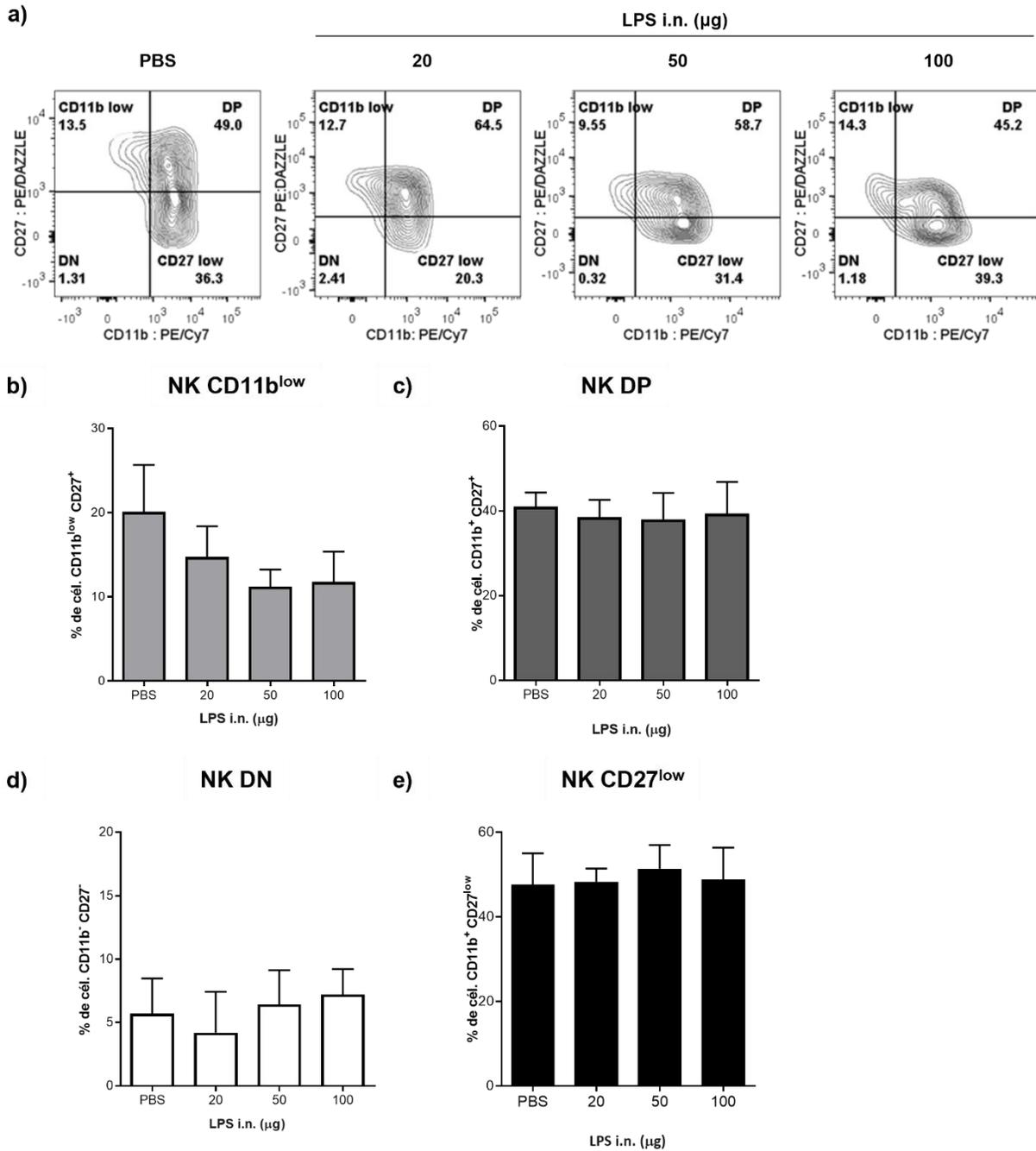


Figura 34. Distribución de estadios de maduración de células NK en cavidad pleural con ALI.

a) Distribución de los estadios de maduración de células NK en cavidad peritoneal de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Las poblaciones se representan en *contour plots* en el que cada área delimitada por un contorno equivale al 5% de la población total, debido al escaso número de células capturadas. b) Porcentaje de células DN (CD11b⁻ CD27⁻), c) CD11b^{low} (CD11b^{low} CD27⁻), d) DP (CD11b⁺ CD27⁺) y e) CD27^{low} (CD11b⁺ CD27^{low}) en cavidad pleural. Los *contour plots* son representativos de un experimento individual. (n=5).

6.3.3. Análisis de células NK y estadios de maduración en cavidad peritoneal.

Las células NK totales representaron entre el 0.7% a 1.8% del total de leucocitos obtenidos de la cavidad peritoneal. El porcentaje no varió en los ratones tratados (**Figura 35**).

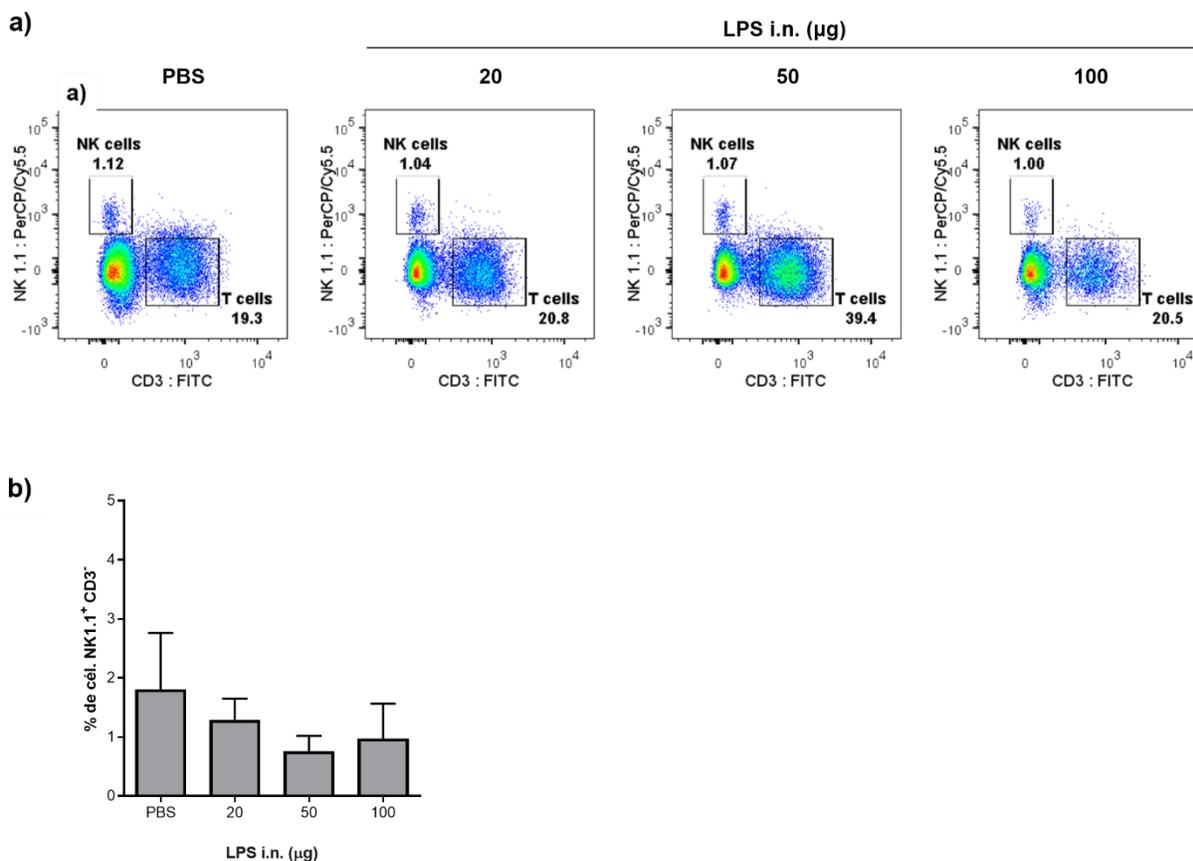


Figura 35. Porcentaje de células NK en cavidad peritoneal con ALI.

a) Poblaciones de células NK (CD3- NK1.1+) en cavidad peritoneal de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de células NK respecto a leucocitos totales en cavidad peritoneal. Los dot plots son representativos de un experimento individual (n=5).

Al analizar los estadios de maduración de las células NK, se observó que la distribución de los estadios es diferente a la observada en la cavidad pleural. Mientras que en cavidad pleural se observó una predominancia de células NK maduras (DP y CD27^{low}), en cavidad peritoneal predominan las células CD11b^{low} y DP (37.1% a 42.3% y 34.4% a 42.5% respectivamente). El estadio CD27^{low} representa el 11.0% a 20.5% y los DN de 6.4% a 9.4%. La proporción de los estadios no fue alterada significativamente durante el ALI (**Figura 36**).

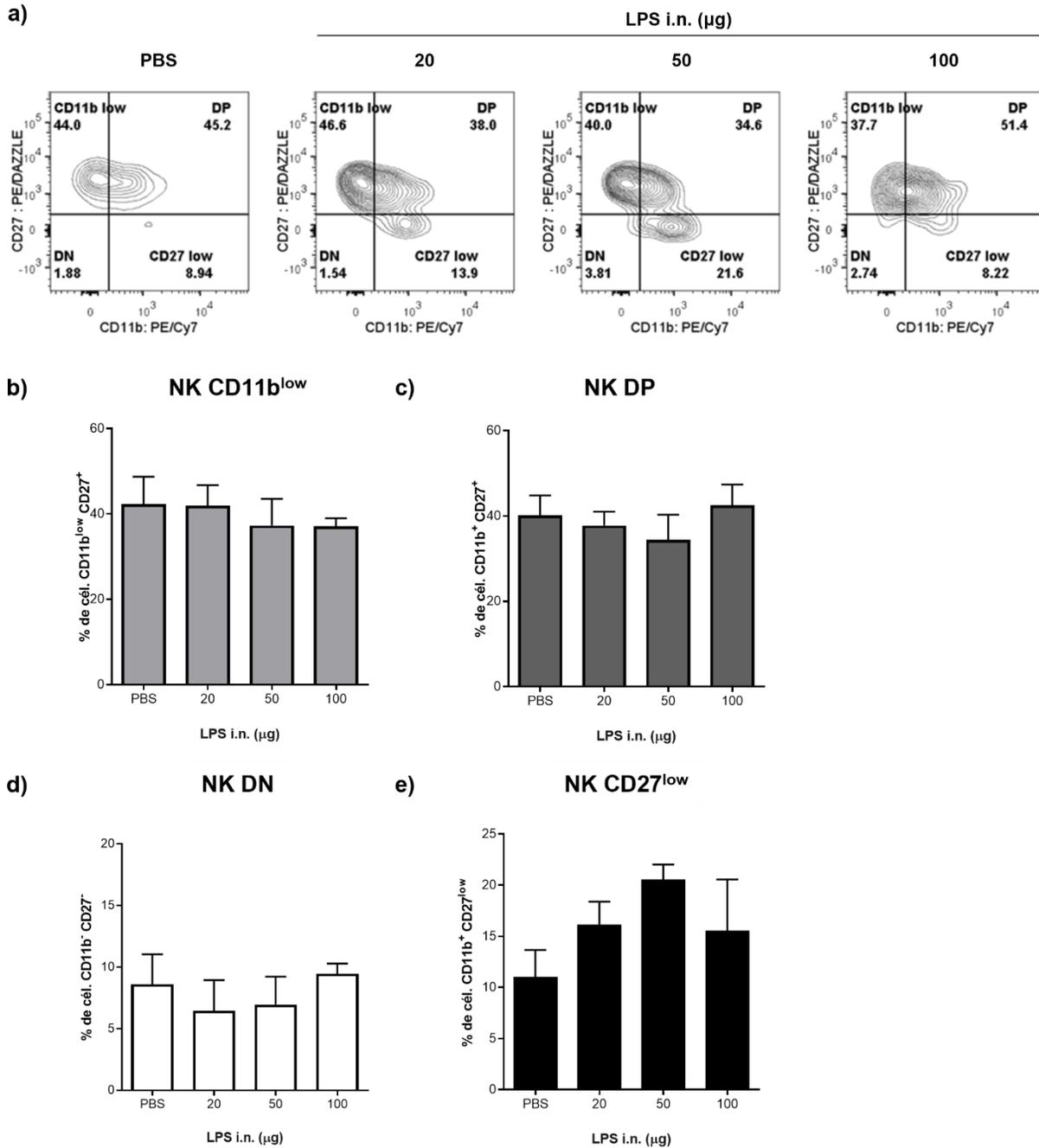


Figura 36. Distribución de estadios de maduración de células NK en cavidad peritoneal con ALI.

a) Distribución de los estadios de maduración de células NK en cavidad pleural de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Las poblaciones se representan en *contour plots* en el que cada área delimitada por un contorno equivale al 5% de la población total, debido al escaso número de células capturadas. b) Porcentaje de células DN (CD11b⁻ CD27⁻), c) CD11b^{low} (CD11b^{low} CD27⁺), d) DP (CD11b⁺ CD27⁺) y e) CD27^{low} (CD11b⁺ CD27^{low}) en cavidad peritoneal. Los *contour plots* son representativos de un experimento individual (n=5).

6.3.4. Análisis de células NK y estadios de maduración en bazo.

El porcentaje de células NK totales en el bazo no se alteró con los tratamientos. Las células NK representan el 4.0% a 2.9% del total de leucocitos (**Figura 37**).

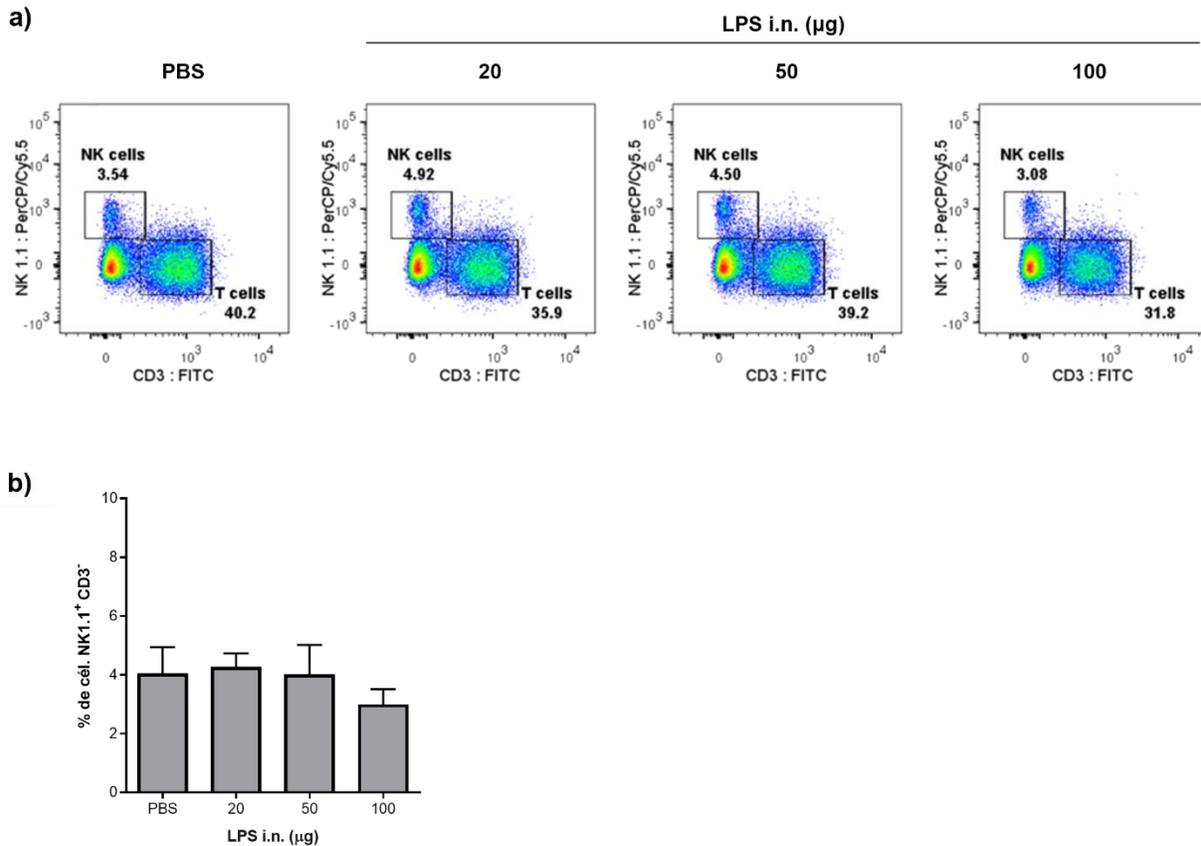


Figura 37. Porcentaje de células NK en bazo con ALI.

a) Poblaciones de células NK ($\text{CD}3^- \text{NK}1.1^+$) en bazo de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. b) Porcentaje de células NK respecto a leucocitos totales en bazo. Los *dot plots* son representativos de un experimento individual ($n=5$).

La distribución de los estadios de maduración fue diferente a la observada en pulmón y a las cavidades: siendo el estadio $\text{CD}27^{\text{lo}}$ el de mayor porcentaje (52.5% a 57.6%), seguido de DP (17.8% a 22.6%), NK $\text{CD}11\text{b}^{\text{lo}}$ (13.1% a 15.6%) y DN (7.8% a 11.6%). Esta distribución no fue alterada con los tratamientos (**Figura 38**).

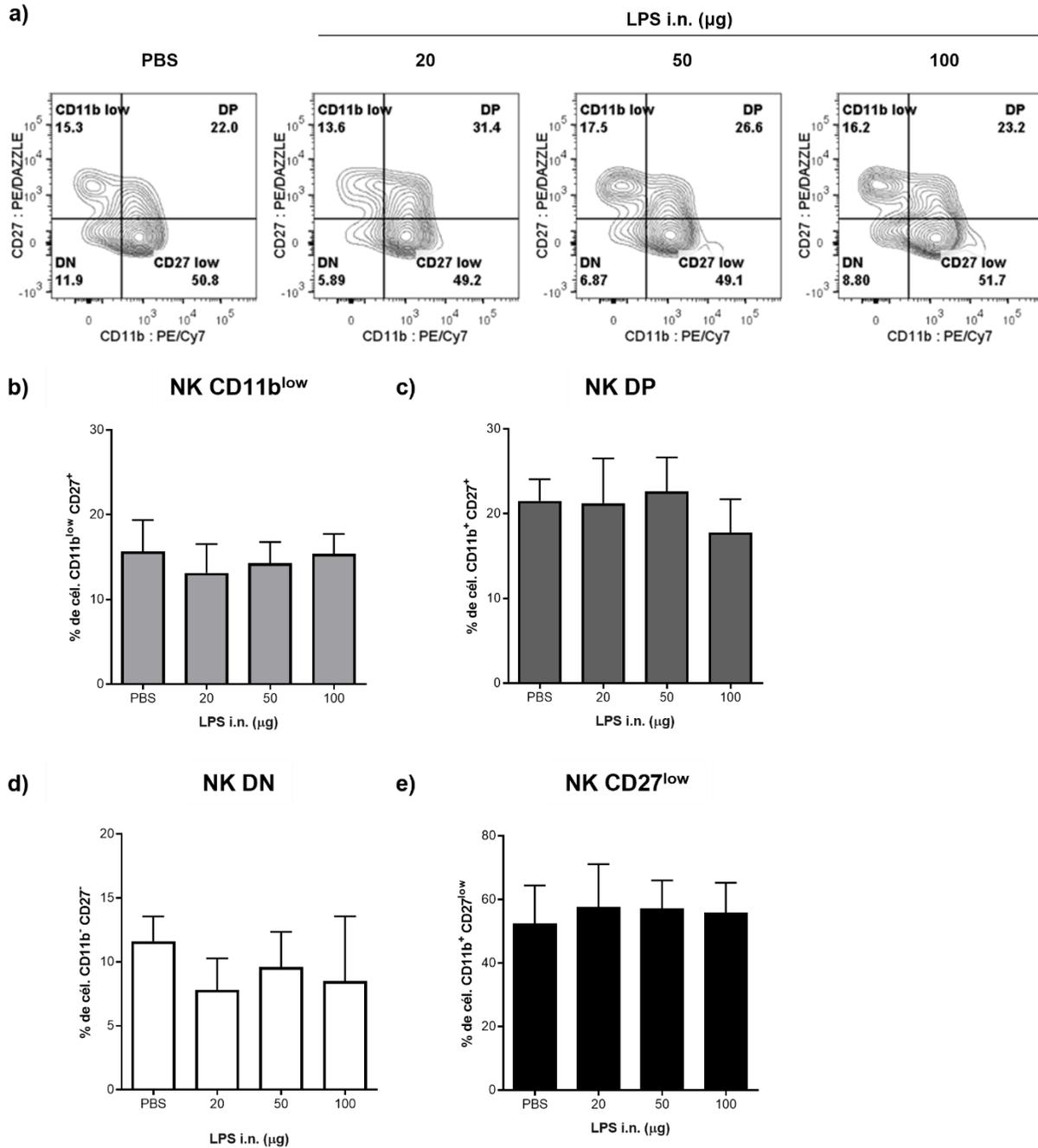


Figura 38. Distribución de estadios de maduración de células NK en bazo con ALI.

a) Distribución de los estadios de maduración de células NK en bazo de ratones control y tratados con LPS analizados por citometría de flujo. Las poblaciones se representan en *contour plots* en el que cada área delimitada por un contorno equivale al 5% de la población total, debido al escaso número de células capturadas. b) Porcentaje de células DN (CD11b⁻ CD27⁻), c) CD11b^{low} (CD11b^{low} CD27⁻), d) DP (CD11b⁺ CD27⁺) y e) CD27^{low} (CD11b⁺ CD27^{low}) en bazo. Los *contour plots* son representativos de un experimento individual (n=5).

La distribución de los estadios de maduración de las células NK en los diferentes órganos estudiados en ratones control se resume en la **Figura 39**.

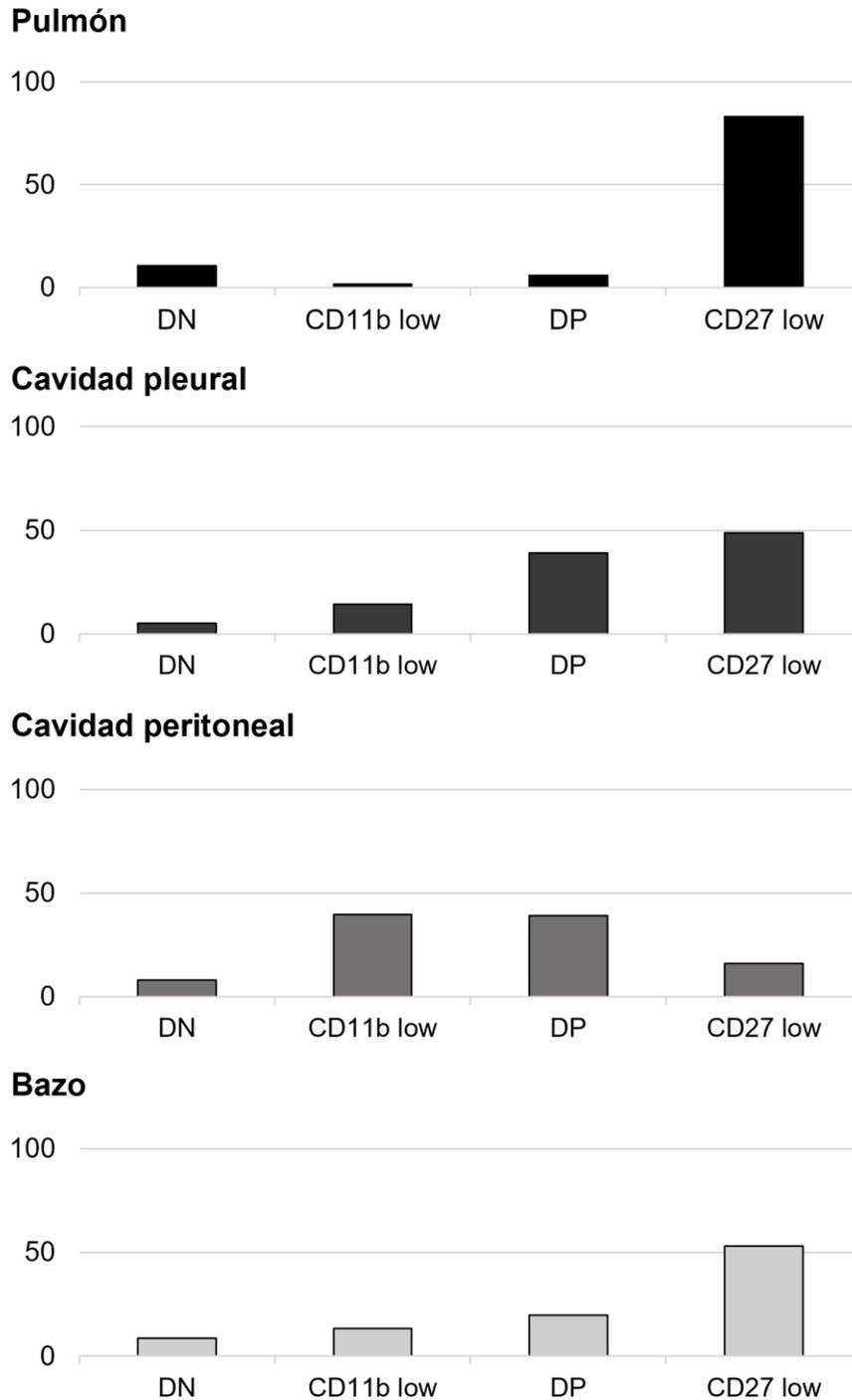


Figura 39. Comparación de la distribución de estadios de maduración de células NK en los órganos estudiados en el modelo de ALI.

Las gráficas de barras representan el porcentaje de cada estadio respecto al total de células NK de cada órgano en ratones control. Realizado en Microsoft Excel.

6.3.5. Análisis de la expresión de CD69 en células NK en los órganos.

Con el objetivo de verificar si los tratamientos de LPS estimulan la activación de las células NK se analizó la expresión del marcador CD69. No se observaron diferencias significativas en la expresión del marcador CD69 entre tratamientos y en los órganos estudiados en este modelo de ALI. Dado que los experimentos de LB y células NK se hicieron simultáneamente, consideramos que el marcador CD69 no fue el adecuado para evaluar la activación de las células NK (**Figura 40**).

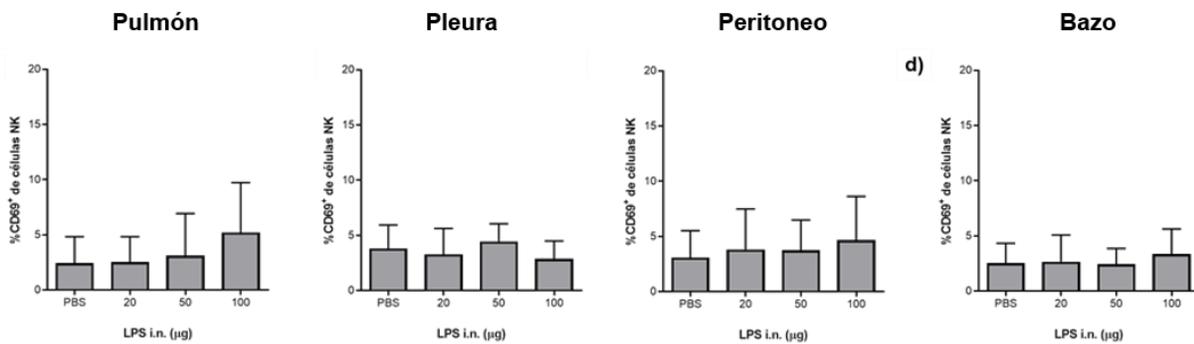


Figura 40. Expresión de CD69 en células NK aislados de pulmón en diferentes sitios anatómicos. Porcentaje de células NK CD69⁺ en a) pulmón, b) cavidad pleural, c) cavidad peritoneal y d) bazo. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (n=5).

7. DISCUSIÓN

El ARDS es una complicación grave de infecciones respiratorias y con un alto grado de mortalidad y poco éxito en los tratamientos disponibles, por lo que es relevante elucidar los mecanismos de inmunopatogénesis involucrados ⁹. Actualmente, el conocimiento de los mecanismos de inmunopatogenia es limitado, y no ha permitido desarrollar una terapia efectiva hasta la fecha ^{5,7}.

Para estudiar la respuesta inflamatoria que da origen al ARDS se utilizó un modelo de administración intranasal de LPS en ratones C57BL/6. Los resultados mostraron que este modelo ocasiona alteraciones de la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar y la celularidad de los espacios alveolares desde la administración de 20 µg de LPS y que el daño histológico fue notorio en las dosis de 50 µg y 100 µg. Si bien, se cumplieron con los criterios necesarios para validar el modelo de acuerdo a Matute-Bello, otros investigadores incluyen el análisis de expresión de mRNA de IL-1β, TNFα e IL-6 a partir del tejido pulmonar o la cuantificación de estas citocinas en el BAL o sangre periférica. Dado que este trabajo estuvo dirigido a la identificación de subpoblaciones de LB y células NK, no se incluyó el análisis cuantitativo de las citocinas, el cual podría ser incluido en trabajos posteriores ya que se han identificado subpoblaciones que ven alteradas su distribución durante el ALI.

Al estudiar la distribución de los LB se encontró que el porcentaje de LB totales en el pulmón disminuye en función de la intensidad del ALI (de acuerdo a la dosis de LPS administrada y los efectos observados en el tejido pulmonar). Esta disminución en parte se debe al infiltrado de neutrófilos descrito en la validación del modelo de estudio. A pesar de que se realizó el conteo de las células mediante microscopía óptica para la tinción con anticuerpos fluorescentes, no pudieron utilizarse perlas de referencia para la cuantificación absoluta de células por citometría de flujo y relacionar la cantidad real de linfocitos B (y células NK) aislados de cada sitio anatómico. Los resultados sugieren que el número de LB también se vería disminuido en la progresión del ALI. Por el momento no se encontraron trabajos que describan esta condición.

El análisis de las subpoblaciones de LB mostró que en el pulmón la subpoblación B2 es predominante y disminuye durante el desarrollo del ALI (de 95.2% a 84.8%). Al analizar la subpoblación B1-b se identificaron dos subpoblaciones con diferente expresión de CD11b: B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{Hi}. Durante el desarrollo del ALI se observó un incremento del porcentaje de las subpoblaciones B1-a y B1-b CD11b^{Hi} hasta el 2% y 10.1%, respectivamente. De las subpoblaciones del pulmón, B1-b CD11b^{Hi} es la que mayor porcentaje de células expresan el

marcador de activación CD69. Esto indica que esta subpoblación está reaccionando de manera temprana al proceso inflamatorio, a pesar de que la cantidad de estas células en el pulmón con ALI es escasa. La utilización de otros marcadores de activación para linfocitos B como CD40, CD80 y CD86 y ampliar el tiempo de análisis hasta 48 h, podría revelar si existen diferentes patrones específicos de activación entre las subpoblaciones de LB ⁸⁷.

Otra característica importante que se observó fue que las subpoblaciones B2 y B1-b mostraron patrones de expresión específicos de los marcadores CD19 y CD11b. Ambos marcadores están relacionados con la señalización intracelular de los linfocitos B.

CD19 es una glucoproteína transmembranal de 95 KDa que se expresa de manera específica en los LB. CD19 junto con el receptor del complemento 2 (CR2 o CD21), CD81 y CD255 forman un complejo que regula el umbral de activación del BCR. La unión del receptor CR2 a partículas opsonizadas permite la fosforilación de CD19 en los residuos de tirosina de su fragmento intracelular y esto a su vez potencia la fosforilación de los dominios de activación ITAM presentes en CD79a y CD79b por las cinasas Lyn y Syk. Recordando que CD79a y CD79b son las proteínas encargadas de la señalización del BCR ^{88,89}. Por tanto CD19 regula la activación del BCR y por tanto las señales de supervivencia, proliferación y diferenciación de los LB tras la unión al antígeno ⁹⁰⁻⁹².

CD11b es una glucoproteína de aprox. 127 KDa que junto con la proteína CD18 forman la integrina Mac-1. Las integrinas son proteínas de membrana que permiten la adhesión celular y a la matriz extracelular ³⁸. Para que las integrinas puedan unirse a su ligando, es necesario que su conformación cambie a una forma desplegada y para esto es necesario que la célula que las expresa reciba señales de activación mediante los receptores de quimiocinas o del BCR (en el caso de los LB). La activación de estos receptores favorece el anclaje de Mac-1 al citoesqueleto mediante la proteína talina y vinculina ocasionando el despliegue de la integrina Mac-1. Una vez que Mac-1 cambia su conformación, puede unirse al ligando ICAM-1 en otras células ⁹³. Esta unión puede favorecer la proyección del citoplasma sobre la superficie de las células vecinas o favorecer la polarización de complejos de receptores CD19, BCR, receptores de quimiocinas o integrinas para aumentar la adhesión y favorecer la fagocitosis.

Retomando a las subpoblaciones de LB estudiadas en el pulmón, queda claro que los marcadores CD19 y CD11b están relacionados con el reconocimiento de señales en el medio y adhesión en el tejido o con las células presentes en el pulmón. La subpoblación B1-b CD11b^{Hi} al ser la de mayor expresión de CD11b podría estar relacionada con una mayor adhesión en el

tejido o una mayor dinámica en la membrana en la que la formación de complejos de receptores o proteínas de membrana podría ser diferente a la observada en la subpoblación B1-b CD11b^{mid}.

Ding y colaboradores han relacionado a CD11b con la regulación de la señalización del BCR, en un contexto de autoinmunidad ⁹⁴. Utilizando un modelo de lupus eritematosos sistémico con ratones *knock-out* a *ITGAM*^{-/-} (gen que expresa CD11b), observaron que al estimular LB que no expresaban CD11b con anticuerpos anti-IgM estos mostraron una respuesta hiperproliferativa, con una mayor supervivencia respecto a las células del organismo *wild type* ^{95,96}. Zhou y cols. reportan una relación de CD11b con las moléculas reguladoras del BCR pLyn y CD22; y un aumento en la producción de anticuerpos IgG de alta afinidad en LB de ratones *knock-out* a *ITGAM*^{-/-}, respecto a las células del organismo *wild-type* ⁹⁷. Además, la ausencia de CD11b en este modelo ocasionó defectos en los reguladores negativos pLyn y CD22 del BCR e incrementando la colocalización de pSyk y el BCR después de su estimulación. A partir de estas premisas queda pendiente analizar si existen diferencias en la señalización de BCR, producción de citocinas o expresión génica entre las subpoblaciones B1-b en función de la expresión de CD11b.

Otros trabajos han reportado que los LB B1, particularmente B1-a, producen citocinas inflamatorias (GM-CSF) y antiinflamatorias (IL-10, IL-35 y TGF- β), tiene comunicación a través de vesículas extracelulares con macrófagos y pueden realizar presentación de antígenos ^{46,64,98,99}. Sin embargo, las funciones de la población B1-b no han sido descritas a detalle y se los trabajos se han limitado a su identificación y fenotipo.

Proponemos estudiar el cambio de la distribución de la subpoblación de LB en el pulmón y la pleura: determinar si la disminución de LB B2 en pulmón se debe a su muerte celular o a su salida del tejido o a la migración de LB B1 a partir de la circulación o la pleura. La migración de LB B1-a ya ha sido probada mediante experimentos de transferencia adoptiva ⁶⁶.

Las subpoblaciones B1-b también fueron identificadas en la cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo. De igual manera se observó que la distribución y las diferencias de expresión de CD19 y Cd11b de las subpoblaciones B2, B1-b y B1-a es específica de cada uno de los órganos estudiados.

Respecto a las células NK en el ALI, para conocer la distribución de las células NK (CD3⁻ NK1.1⁺) en los órganos y cavidades seleccionados se identificaron los estadios inmaduros de NK DN (CD11b⁻ CD27⁻) y CD11b^{lo} (CD11b^{lo} CD27⁺), y los estadios maduros DP (CD11b⁺ CD27⁺) y CD27^{lo} (CD11b⁺ CD27^{lo}). Las células NK maduras DP presentan alta actividad de secreción de

citocinas y citotoxicidad, mientras que las células con la mayor madurez CD27^{lo} se caracterizan por requerir un mayor grado de estímulo para producir citocinas y tener capacidad citotóxica. Lo anterior se atribuye a la expresión de moléculas inhibitorias en esta subpoblación particular. El análisis mostró que la distribución de las subpoblaciones de células NK es órgano-específica en pulmón, cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo, indicando que el microambiente determina el tipo de células NK residentes. Lo cual coincide con lo descrito por Rasid anteriormente ³³.

El estadio de maduración predominante en el pulmón fueron las células NK maduras CD27^{low}. De forma notable, en el pulmón de ratones control se encontró un porcentaje pequeño de células NK DP que aumentó de 3.9% hasta 9.9% en los pulmones con ARDS. Dado que estas células NK DP han sido descritas como células con una mayor capacidad productora de citocinas respecto a las células NK CD27^{low}, proponemos que estas células están participando en la modulación de la respuesta inflamatoria en el pulmón en respuesta al ALI.

Es relevante recalcar que en las cavidades pleural y peritoneal existe un mayor porcentaje de células NK DP que pueden diferenciarse a células NK CD27^{low}. Hasta el momento no se ha descrito si estas cavidades pueden funcionar como reservorios a partir de los cuales pueden diferenciarse células NK y migrar a otros órganos.

Las células NK son linfocitos cuya función efectora convencional es inducir una potente respuesta inflamatoria contra patógenos a través de su actividad citotóxica y la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ . Sin embargo, recientemente se reportó que las células NK también pueden amortiguar las respuestas inmunes al producir la citoquina antiinflamatoria IL-10, pero sólo durante las infecciones sistémicas y no las localizadas ⁷⁴. Estas evidencias ya publicadas apuntan a una función reguladora anti-inflamatoria de las células NK en el caso de infecciones sistémicas, que presentan características similares al ARDS/ALI. La infección por citomegalovirus murino (MCMV), la malaria cerebral experimental (MEC) y la sepsis inducida por CLP son los tres modelos animales de infección sistémica en los que se ha demostrado una función inmunorreguladora beneficiosa de la IL-10 producida por las células ⁷⁵⁻⁷⁷. Por otro lado, la leishmaniasis visceral experimental y la infección sistémica por *L. monocytogenes* son los dos modelos que han mostrado un efecto perjudicial de la IL-10 producida por las células NK sobre la resistencia del huésped inmune contra el patógeno ⁷⁸⁻⁸⁰.

La presencia de células NK productoras de IL-10 se reportó en pacientes con sepsis ⁷⁷ indicando un potencial papel relevante en esta enfermedad sistémica, la cual tiene características similares al ARDS. Por lo anterior, y en conjunto con los hallazgos de este trabajo, lo siguiente sería analizar si los estadios de células NK predominante en el pulmón y durante el ALI son

células productoras de IL-10. Es relevante analizar la producción de otras citocinas que han sido asociadas al proceso inflamatorio, y averiguar si tienen un papel relevante en el control de la respuesta inflamatoria o bien contribuyen al daño inmunopatológico observado en el ALI. La disminución en el porcentaje de células NK en el pulmón durante el ALI debe ser analizada en términos de células absolutas y saber si podría estar relacionada con la respuesta inflamatoria.

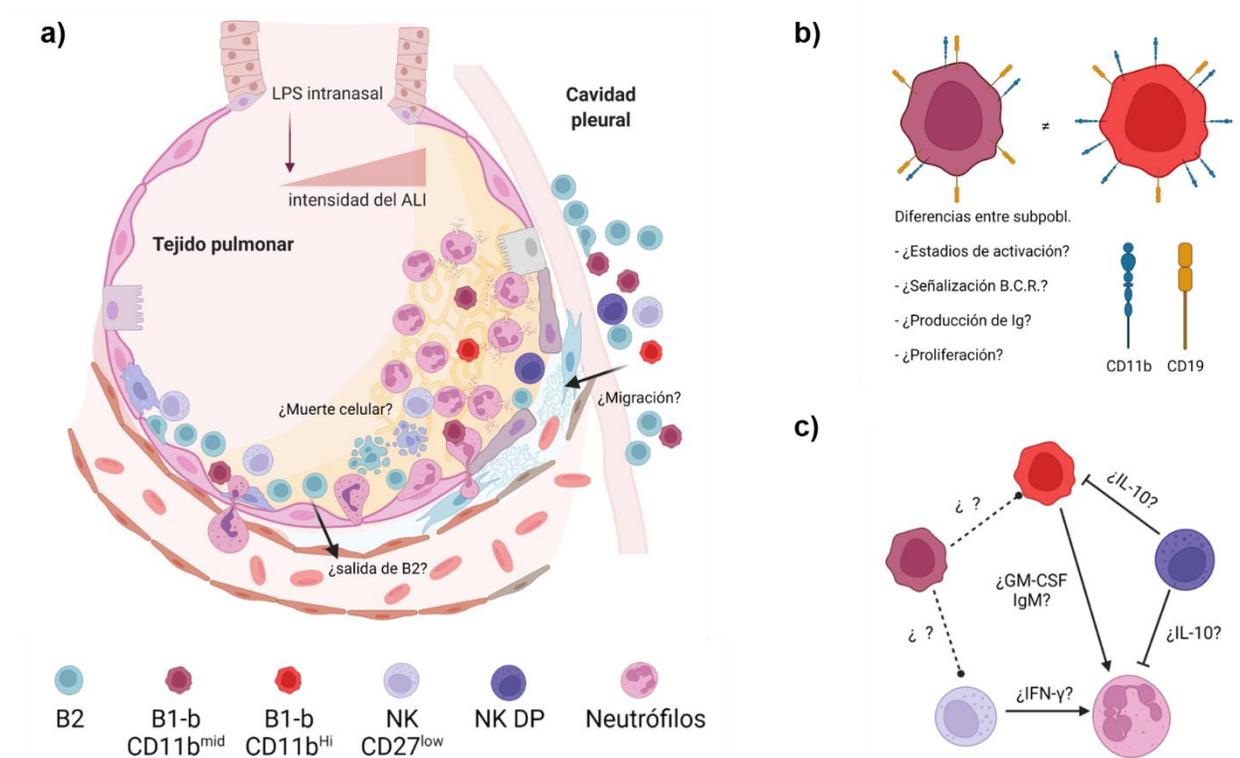


Figura 41. Evidencias observadas sobre las poblaciones de linfocitos B y células NK en el modelo de ALI y perspectivas del proyecto.

a) El desarrollo del daño pulmonar agudo en el pulmón ocasionó una alteración de la distribución de la celularidad en el pulmón: aumento del porcentaje de neutrófilos, disminución de linfocitos B totales y células NK, aumento de la subpoblaciones B1-b (particularmente de la B1-b CD11b^{Hi}) y cambio de la distribución de células NK CD27^{low} y CD11b^{Hi} y CD27⁺. Perspectivas a seguir en el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B1-b. b) Verificar las diferencias que las subpoblaciones B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{Hi} tienen en la expresión de marcadores de activación, señalización intracelular al entrecruzamiento del B.C.R., cuantificación e identificación de las inmunoglobulinas producidas antes los estímulos, proliferación y producción de citocinas en cultivo. c) Verificar la interacción entre las células estudiadas con los neutrófilos y otras células en el ambiente pulmonar mediante las citocinas descritas en la literatura y una probable interacción célula-célula.

8. CONCLUSIONES

1. Validamos un modelo de daño pulmonar agudo (ALI) en ratones C57BL/6 al administrar LPS por vía intranasal.
2. Encontramos un aumento de la subpoblación B1-b CD11b^{Hi} en el pulmón y con un perfil de activación temprana al desarrollarse el ALI.
3. Determinamos la distribución órgano-específico de las subpoblaciones B2, B1-b CD11b^{mid} y B1-b CD11b^{Hi} con base a la expresión de CD19 y CD11b.
4. Caracterizamos la distribución de linfocitos B y de sus poblaciones en pulmón, cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo, en ratones sanos y ratones que desarrollaron ALI.
5. Encontramos una disminución de las células NK en el pulmón al desarrollarse el ALI y un cambio en la distribución de los estadios CD27^{low} y DP (CD11b⁺ CD27⁺) de células NK durante el desarrollo del ALI.
6. Determinamos la distribución de las células NK y de sus estadios de maduración en pulmón, cavidad pleural, cavidad peritoneal y bazo, en ratones sanos y ratones que desarrollaron ALI.
7. Es necesario evaluar la expresión de moléculas y la producción de citocinas asociadas a la activación y funcionalidad de las subpoblaciones de linfocitos B1-b CD11b^{mid}, B1-b CD11b^{Hi}, células NK DP y CD27^{low} para determinar su participación en el ALI.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1334–1349 (2000).
2. Johnson, E. R. & Matthay, M. A. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* **23**, 243–252 (2010).
3. ARDS Definition Task Force *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* **307**, 2526–2533 (2012).
4. Fan, E., Brodie, D. & Slutsky, A. S. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA* **319**, 698 (2018).
5. Eworuke, E., Major, J. M. & Gilbert McClain, L. I. National incidence rates for Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and ARDS cause-specific factors in the United States (2006–2014). *Journal of Critical Care* **47**, 192–197 (2018).
6. Bellani, G. *et al.* Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* **315**, 788 (2016).
7. El-Haddad, H., Jang, H., Chen, W. & Soubani, A. O. Effect of ARDS Severity and Etiology on Short-Term Outcomes. *Respir Care* **62**, 1178–1185 (2017).
8. Rubenfeld, G. D. *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1685–1693 (2005).
9. Gattinoni, L. & Quintel, M. ARDS Why Is Acute Respiratory Distress Syndrome So Important for Critical Care? *Am J Respir Crit Care Med* **194**, 1051–1052 (2016).
10. Laffey, J. G. *et al.* Geo-economic variations in epidemiology, patterns of care, and outcomes in patients with acute respiratory distress syndrome: insights from the LUNG SAFE prospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine* **5**, 627–638 (2017).
11. Ely, E. W. *et al.* Recovery rate and prognosis in older persons who develop acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Ann. Intern. Med.* **136**, 25–36 (2002).
12. Goss, C. H., Brower, R. G., Hudson, L. D., Rubenfeld, G. D., & ARDS Network. Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit. Care Med.* **31**, 1607–1611 (2003).
13. Rubenfeld, G. D. Epidemiology of acute lung injury. *Crit. Care Med.* **31**, S276-284 (2003).
14. Brun-Buisson, C. *et al.* Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units: Results from the ALIVE study. *Intensive care medicine* **30**, 51–61 (2004).
15. Salim, A. *et al.* Acute Respiratory Distress Syndrome in the Trauma Intensive Care Unit: Morbid but Not Mortal. *Arch Surg* **141**, 655–658 (2006).
16. Cooke, C. R. *et al.* Predictors of hospital mortality in a population-based cohort of patients with acute lung injury. *Crit. Care Med.* **36**, 1412–1420 (2008).
17. Zimmerman, J. J., Akhtar, S. R., Caldwell, E. & Rubenfeld, G. D. Incidence and outcomes of pediatric acute lung injury. *Pediatrics* **124**, 87–95 (2009).
18. Bice, T., Li, G., Malinchoc, M., Lee, A. S. & Gajic, O. Incidence and risk factors of recurrent acute lung injury. *Crit. Care Med.* **39**, 1069–1073 (2011).
19. Neto, A. S. *et al.* Epidemiological characteristics, practice of ventilation, and clinical outcome in patients at risk of acute respiratory distress syndrome in intensive care units from 16 countries (PRoVENT): an international, multicentre, prospective study. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 882–893 (2016).
20. Abe, T. *et al.* Epidemiology and patterns of tracheostomy practice in patients with acute respiratory distress syndrome in ICUs across 50 countries. *Crit Care* **22**, 195 (2018).

21. Hayman, W. R., Leuthner, S. R., Laventhal, N. T., Brousseau, D. & Lagatta, J. M. Cost comparison of mechanically ventilated patients across the age span. *J Perinatol* **35**, 1020–1026 (2015).
22. Robles, A. J. *et al.* Health care utilization and the cost of posttraumatic acute respiratory distress syndrome care: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **85**, 148–154 (2018).
23. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16045 (2016).
24. Faix, J. D. Biomarkers of sepsis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **50**, 23–36 (2013).
25. Bakowitz, M., Bruns, B. & McCunn, M. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in the injured patient. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine* **20**, 54 (2012).
26. Grommes, J. & Soehnlein, O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Mol Med* **17**, 293–307 (2011).
27. Wong, J. J. M., Leong, J. Y., Lee, J. H., Albani, S. & Yeo, J. G. Insights into the immuno-pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med* **7**, (2019).
28. Cheung, O.-Y., Graziano, P. & Smith, M. L. 6 - Acute Lung Injury. in *Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach (Third Edition)* (eds. Leslie, K. O. & Wick, M. R.) 125-146.e3 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-44284-8.00006-5.
29. Azoulay, E. *et al.* Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery. *Crit. Care Med.* **30**, 781–786 (2002).
30. Azoulay, É. & Darmon, M. Acute respiratory distress syndrome during neutropenia recovery. *Crit Care* **14**, 114 (2010).
31. Kim, K. D. *et al.* Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat. Med.* **13**, 1248–1252 (2007).
32. Kelly-Scumpia, K. M. *et al.* B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1673–1682 (2011).
33. Rasid, O., Ciulean, I. S., Fitting, C., Doyen, N. & Cavillon, J.-M. Local Microenvironment Controls the Compartmentalization of NK Cell Responses during Systemic Inflammation in Mice. *J. Immunol.* **197**, 2444–2454 (2016).
34. Roth, D. B. V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiology Spectrum* **2**, (2014).
35. Chung, J. B., Silverman, M. & Monroe, J. G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* **24**, 343–349 (2003).
36. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**, 959–971 (2013).
37. Kenneth, M., Travers, P. & Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*. (McGraw Hill, 2009).
38. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H. & Pillai, S. *Inmunología básica + StudentConsult: Funciones y trastornos del sistema inmunitario*. (Elsevier España, 2017).
39. Allman, D. & Pillai, S. Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* **20**, 149–157 (2008).
40. Mak, T. W. & Saunders, M. E. 9 - The Humoral Response: B Cell Development and Activation. in *The Immune Response* (eds. Mak, T. W. & Saunders, M. E.) 209–245 (Academic Press, 2006). doi:10.1016/B978-012088451-3.50011-9.
41. Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **13**, 118–132 (2013).
42. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* **11**, 34–46 (2011).
43. Rothstein, T. L., Griffin, D. O., Holodick, N. E., Quach, T. D. & Kaku, H. Human B-1 cells take the stage.

Ann N Y Acad Sci **1285**, 97–114 (2013).

44. Baumgarth, N. A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function. *J. Immunol.* **199**, 3387–3394 (2017).
45. Abrahao, Thalita Balsamo, Freymüller, Edna, Mortara, Renato Arruda & Lopes, José Daniel. Morphological characterization of mouse B1-cells. *Immunobiol.* **208**, 401–411 (2003).
46. Smith, F. L. & Baumgarth, N. B-1 cell responses to infections. *Curr. Opin. Immunol.* **57**, 23–31 (2019).
47. Kantor, A. B. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol. Today* **12**, 389–391 (1991).
48. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. & Malarkannan, S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
49. Cichocki, F., Miller, J. S., Anderson, S. K. & Bryceson, Y. T. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
50. Geiger, T. L. & Sun, J. C. Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology* **39**, 82–89 (2016).
51. Inngjerdingen, M., Kveberg, L., Naper, C. & Vaage, J. T. Natural killer cell subsets in man and rodents. *Tissue Antigens* **78**, 81–88 (2011).
52. Kim, S. *et al.* In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* **3**, 523–528 (2002).
53. Hayakawa, Y. & Smyth, M. J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J. Immunol.* **176**, 1517–1524 (2006).
54. Hayakawa, Y., Huntington, N. D., Nutt, S. L. & Smyth, M. J. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol. Rev.* **214**, 47–55 (2006).
55. Paul, S. & Lal, G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
56. Konjević, G., Vuletić, A. & Džodić, K. M. M. and R. The Role of Activating and Inhibitory NK Cell Receptors in Antitumor Immune Response. *Natural Killer Cells* (2017) doi:10.5772/intechopen.69729.
57. Ljunggren, H. G. & Kärre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**, 237–244 (1990).
58. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* **172**, 2731–2738 (2004).
59. Matute-Bello, G., Frevert, C. W. & Martin, T. R. Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **295**, L379-399 (2008).
60. Perlman, R. L. Mouse models of human disease. *Evol Med Public Health* **2016**, 170–176 (2016).
61. Alm, A.-S. *et al.* Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. *Respir Physiol Neurobiol* **171**, 157–164 (2010).
62. Matute-Bello, G. *et al.* An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 725–738 (2011).
63. D’Alessio, F. R. Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS. *Methods Mol. Biol.* **1809**, 341–350 (2018).
64. Rauch, P. J. *et al.* Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* **335**, 597–601 (2012).
65. Weber, G. F. *et al.* Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *J Exp Med* **211**, 1243–1256 (2014).

66. Aziz, M. *et al.* B-1a cells protect mice from sepsis-induced acute lung injury. *Mol Med* **24**, (2018).
67. Adib-Conquy, M., Scott-Algara, D., Cavaillon, J.-M. & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol Cell Biol* **92**, 256–262 (2014).
68. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. *et al.* Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Crit Care* **16**, R206 (2012).
69. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Fitting, C., Cavaillon, J.-M. & Adib-Conquy, M. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J Immunol* **188**, 5850–5858 (2012).
70. Hervier, B. *et al.* Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon- γ production in patients with active disease. *Arthritis Rheum* **63**, 1698–1706 (2011).
71. Hwang, I. *et al.* Activation mechanisms of natural killer cells during influenza virus infection. *PLoS One* **7**, e51858 (2012).
72. Paolini, R., Bernardini, G., Molfetta, R. & Santoni, A. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev* **26**, 113–120 (2015).
73. Stackaruk, M. L., Lee, A. J. & Ashkar, A. A. Type I interferon regulation of natural killer cell function in primary and secondary infections. *Expert Rev Vaccines* **12**, 875–884 (2013).
74. Perona-Wright, G. *et al.* Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe* **6**, 503–512 (2009).
75. Ali, A. K., Komal, A. K., Almutairi, S. M. & Lee, S.-H. Natural Killer Cell-Derived IL-10 Prevents Liver Damage During Sustained Murine Cytomegalovirus Infection. *Front Immunol* **10**, 2688 (2019).
76. Burrack, K. S. *et al.* Interleukin-15 Complex Treatment Protects Mice from Cerebral Malaria by Inducing Interleukin-10-Producing Natural Killer Cells. *Immunity* **48**, 760-772.e4 (2018).
77. Jensen, I. J. *et al.* NK Cell-Derived IL-10 Supports Host Survival during Sepsis. *J Immunol* **206**, 1171–1180 (2021).
78. Clark, S. E. *et al.* Bacterial Manipulation of NK Cell Regulatory Activity Increases Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection. *PLoS Pathog* **12**, e1005708 (2016).
79. Clark, S. E., Burrack, K. S., Jameson, S. C., Hamilton, S. E. & Lenz, L. L. NK Cell IL-10 Production Requires IL-15 and IL-10 Driven STAT3 Activation. *Front Immunol* **10**, 2087 (2019).
80. Maroof, A. *et al.* Posttranscriptional regulation of Il10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* **29**, 295–305 (2008).
81. De Maria, A. *et al.* Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol* **37**, 445–455 (2007).
82. Li, H. *et al.* Regulatory NK cells mediated between immunosuppressive monocytes and dysfunctional T cells in chronic HBV infection. *Gut* **67**, 2035–2044 (2018).
83. Brockman, M. A. *et al.* IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* **114**, 346–356 (2009).
84. Terryn, S., Gucht, S. & Nauwynck, H. Development and evaluation of antiviral immunoglobulin single variable domains for prophylaxis of rabies in mice. (2016). doi:10.13140/RG.2.2.16191.92322.
85. Sun, F., Xiao, G. & Qu, Z. Murine Bronchoalveolar Lavage. *BIO-PROTOCOL* **7**, (2017).
86. Soutiere, S. E., Tankersley, C. G. & Mitzner, W. Differences in alveolar size in inbred mouse strains. *Respir Physiol Neurobiol* **140**, 283–291 (2004).
87. Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F. & Sanz, I. Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. *Front Immunol* **3**, 302 (2012).

88. Erdei, A. *et al.* New aspects in the regulation of human B cell functions by complement receptors CR1, CR2, CR3 and CR4. *Immunology Letters* **237**, 42–57 (2021).
89. Del Nagro, C. J. *et al.* CD 19 function in central and peripheral B-cell development. *Immunol Res* **31**, 119–131 (2005).
90. Morbach, H. *et al.* CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 889-898.e6 (2016).
91. Fujimoto, M., Poe, J. C., Hasegawa, M. & Tedder, T. F. CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunol Res* **22**, 281–298 (2000).
92. Fujimoto, M., Poe, J. C., Jansen, P. J., Sato, S. & Tedder, T. F. CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *J Immunol* **162**, 7088–7094 (1999).
93. Bouti, P. *et al.* β 2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Frontiers in Immunology* **11**, (2021).
94. Fagerholm, S. C., MacPherson, M., James, M. J., Sevier-Guy, C. & Lau, C. S. The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus. *Lupus* **22**, 657–663 (2013).
95. Ding, C. *et al.* Integrin CD11b negatively regulates BCR signalling to maintain autoreactive B cell tolerance. *Nat Commun* **4**, 2813 (2013).
96. Benimetskaya, L. *et al.* Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nat Med* **3**, 414–420 (1997).
97. Zhou, M. *et al.* Integrin CD11b Negatively Regulates B Cell Receptor Signaling to Shape Humoral Response during Immunization and Autoimmunity. *The Journal of Immunology* **207**, 1785–1797 (2021).
98. Morris, G. *et al.* Emerging role of innate B1 cells in the pathophysiology of autoimmune and neuroimmune diseases: Association with inflammation, oxidative and nitrosative stress and autoimmune responses. *Pharmacol Res* **148**, 104408 (2019).
99. Halperin, S. T., 't Hart, B. A., Luchicchi, A. & Schenk, G. J. The Forgotten Brother: The Innate-like B1 Cell in Multiple Sclerosis. *Biomedicines* **10**, 606 (2022).