
“Participación de macrófagos CD64+ de lámina propia en la homeostasis intestinal”

Bioquímica Lisa Maccio Maretto

Directora de Tesis: Prof. Dra. Silvia G. Correa

Dra. Silvia Correa
Firma Directora de Tesis

Dra. Claudia Sotomayor
Firma Miembro Comisión

Dra. Gladys Granero
Firma Miembro Comisión

Dr. Germán Gil
Firma Miembro Comisión

Firma Evaluador/a Externo/a

Indice

| | |
|---|-----|
| Abreviaturas | 3 |
| Resumen..... | 6 |
| Abstract | 9 |
| Introducción | 12 |
| La inmunidad intestinal y la microbiota | 13 |
| Inmunoglobulinas (Igs) presentes en el intestino..... | 18 |
| Macrófagos intestinales..... | 20 |
| Receptores de la IgG | 23 |
| Objetivos | 28 |
| Resultados | 29 |
| Capítulo I | 30 |
| Capítulo II | 56 |
| Discusión | 79 |
| Conclusión..... | 99 |
| Materiales y Métodos | 102 |
| Bibliografía..... | 115 |
| Producción Científica..... | 134 |
| Agradecimientos | 136 |

Abreviaturas

Ags: antígenos

APC: alofocianina

AT: azul de Tripán

CEI: células epiteliales intestinales

CFSE: éster de succinimidil-carboxifluoresceína

CIs: complejos inmunes

CIs OVA-FITC: complejos inmunes OVA-IgG anti-OVA marcados con FITC

CMH-II: antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

CR3: receptor del complemento

CX3CR1: receptor de la fractalquina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: dimetilsulfóxido

DP: doble positivas

DSS: dextran-sulfato de sodio

DTT: DL-dithiothreitol

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EGF: factor de crecimiento epitelial

EII: enfermedades inflamatorias intestinales

Fc γ RI/CD64: receptor de alta afinidad de la cadena γ de la IgG

FCS: del inglés forward scatter

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GALT: tejido linfoide asociado al intestino

GL: ganglios linfáticos

GLI: ganglios linfáticos inguinales

GLM: ganglios linfáticos mesentéricos

GPI: glicosilfosfatidilinositol
HEV: endotelio alto de las vénulas postcapilares
IFM: intensidad de fluorescencia media
IFN: interferon
IgAs: Inmunoglobulina A secretoria
IgG: Inmunoglobulina G
IgGne: Inmunoglobulina G no específica para OVA
Igs: inmunoglobulinas
IL-6: interleuquina 6
IL-10: interleuquina 10
kDa: kilo Dalton
LL: líquido luminal
LP: lámina propia
LPS: lipopolisacárido
MØs : macrófagos
MF: materia fecal
MO: médula ósea
OVA: ovoalbúmina
PAMP: patrón molecular asociado a patógenos
pANCA: anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo perinucleares
PBS: tampón fosfato salino
PE: ficoeritrina
PFA: p-formaldehído
PRR: receptores de reconocimiento de patrones
SCFA: ácidos grasos de cadena corta, por sus siglas en inglés
SFB : suero fetal bovino
SSC: del inglés side scatter

TLR: receptor de tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral de tipo α

TSLP: linfopoyetina del estroma tímico

La inmunidad del tracto intestinal involucra una compleja red de interacciones entre el epitelio, la microbiota y los metabolitos que genera, y las células inmunes. El componente mayoritario de la microbiota son bacterias que se distribuyen como un gradiente desde el intestino delgado al colon, en donde alcanzan su concentración máxima. Cuando el sofisticado equilibrio establecido entre microbiota y huésped se altera y se produce el ingreso de microorganismos a la mucosa intestinal, se estimula un estado inflamatorio en muchos casos difícil de contrarrestar que puede conducir al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales. Los macrófagos (MØs), células inmunes capaces de eliminar las bacterias través de la fagocitosis mediada por receptores, juegan un papel central en el desarrollo de dichas enfermedades. En el presente trabajo de Tesis se describió la modulación del receptor CD64 (FcγRI) en macrófagos de lámina propia de colon en condiciones inflamatorias usando como modelo la colitis inducida por dextran sulfato de sodio (DSS). Utilizando citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, se encontró que los macrófagos residentes identificados con el marcador F4/80, un marcador de linaje de función desconocida, disminuyen la expresión de CD64 durante la colitis, probablemente debido a un reciclado más activo y rápido del receptor estimulado por el ingreso de bacterias. La misma modulación se observó en experimentos de transferencia de células mononucleares de médula ósea, indicando que son las señales del ambiente y no las características intrínsecas de las células, las responsables del cambio. En el estado inflamatorio, se alteró la distribución homogénea observada en condiciones homeostáticas, predominando los agregados alrededor de focos de tejido injuriado donde la abundancia de antígenos probablemente sería mayor. Los datos de esta Tesis también mostraron que el uso de medios condicionados para mimetizar el

ambiente intestinal, si bien no reproduce completamente los efectos observados en los MØs aislados de LP, permitió demostrar que la disminución en la frecuencia de células que expresan el marcador CD64 ocurre exclusivamente en presencia de complejos inmunes, aún en condiciones sumamente inflamatorias. Estos resultados fueron consistentes con la disminución en la frecuencia y la expresión del marcador CD64 detectada en MØs de LP de ratones DSS aislados cuando la severidad en injuria y la perturbación de la permeabilidad sugieren que habría abundancia de CIs en el tejido. Al evaluar en la materia fecal la presencia de complejos inmunes formados por bacterias, se encontró que en la condición DSS la cantidad de bacterias recubiertas, tanto con IgG como con IgA, fue mayor comparada con la condición control. Durante el desarrollo de la colitis, la evaluación día por día mostró que los complejos inmunes dobles positivos incrementaron rápidamente y se mantuvieron en la etapa de mayor severidad, en detrimento de complejos inmunes formados por bacterias y sólo una de las inmunoglobulinas (IgG ó IgA). Del estudio de líquidos luminales intestinales se concluyó que aquellos provenientes de animales DSS tuvieron una capacidad opsonizante más potente, con una significativa influencia de la IgG y que serían estas diferencias, y no los cambios de la microbiota, las que expliquen los distintos patrones detectados en relación a los controles. Las bacterias opsonizadas con IgG + IgA, fijadas o viables provenientes de animales DSS estimularon la producción de citoquinas tales como IL-6, IL-10, TNF y nitritos en macrófagos extraídos de lámina propia. Finalmente, cuando macrófagos extraídos de lámina propia fueron estimulados con bacterias comerciales (*E. coli* pHrodo Green) opsonizadas con líquidos luminales del colon se evidenció una clara partición entre células con expresión elevada (CD64^{hi}) o intermedia (CD64^{int}) del marcador CD64. En todas las condiciones evaluadas los macrófagos CD64^{hi} tuvieron mayor capacidad fagocítica, en tanto que las células CD64^{int} de menor actividad fagocítica, mostraron un incremento significativo en la

incorporación de bacterias sólo cuando estuvieron opsonizadas con líquido luminal DSS. La potencia de la doble opsonización incluiría estimulación a través de CD64 y también del receptor Dectina-1. Los resultados de este trabajo demostrarían que en condiciones inflamatorias, cuando la exposición de la mucosa a antígenos luminales se exagera, los macrófagos intestinales modulan la expresión de CD64, dirigiendo su polarización hacia un fenotipo restaurador, con gran capacidad fagocítica y liberación de citoquinas que ayudarían a controlar la inflamación y reparar el tejido. En conclusión, este trabajo de Tesis contribuyó al conocimiento de la función del marcador CD64 en macrófagos de la lámina propia colónica evidenciando que es un receptor funcional tanto en condiciones homeostáticas como en un contexto inflamatorio, capaz de modularse según los requerimientos inmunológicos del tejido. Estos resultados remarcan la plasticidad de los macrófagos CD64+ de lámina propia de colon en el complejo escenario de la mucosa intestinal. Por otra parte, la existencia de poblaciones heterogéneas y las diferencias asociadas a especies bacterianas y a la composición del líquido luminal muestran que es necesario seguir trabajando en la caracterización de dichas macrófagos en cada modelo en particular para un conocimiento más preciso y completo de la respuesta que desencadenaría un potencial estímulo inflamatorio.

Abstract

The gastrointestinal tract immunity involves a complex net of interactions between epithelium, microbiota and its metabolites and immune cells. Regarding to microbiota, its main component are bacteria that distribute in a gradient from small intestine to colon, where they reach their maximum concentration. When the sophisticated balance established between microbiota and its host is disturbed, allowing the entry of microorganisms to the intestinal mucosa, an inflammatory status hard to counteract is stimulated and this can lead to the development of inflammatory bowel diseases. Macrophages, immune cells in charge of bacterial clearance through receptor mediated phagocytosis, play a central role in the development of such diseases. In the present thesis work the modulation of the CD64 receptor (FcγRI) in colon lamina propria macrophages in inflammatory conditions using dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis as a model has been described. Using flow cytometry and fluorescence microscopy, we found that resident macrophages identified with F4/80, a lineage marker with unknown functions, reduce CD64 expression during colitis, probably because of a faster and more active recycling of the receptor, stimulated by the bacterial entrance. Same modulation was observed in adoptive transference experiments of bone marrow mononuclear cells, indicating that environmental signals but not cellular intrinsic features are responsible of the shift. In the inflammatory state, the homogeneous and organized distribution observed in homeostatic conditions was modified, prevailing clusters around injured tissue spotlights where antigens abundance might be higher. In this work, mimicking the intestinal environment with conditioned media demonstrated that the reduction in the frequency of cells expressing CD64 marker occurs exclusively in presence of immune complexes, even in highly inflammatory conditions. This was consistent with the decrease in

frequency and intensity of expression of CD64 marker detected in lamina propria MØs from DSS-treated mice isolated at times when the severity at the damage points and the permeability disturbance suggest that there might be immune complexes abundance in the tissue. When evaluating in feces the presence of immune complexes composed of bacteria, in DSS condition, the frequency of bacteria covered both by IgG and IgA was higher compared to the control condition. During the development of colitis, the day-by-day evaluation evidenced that double positive immune complexes increased rapidly and were maintained in the stage of greater severity, to the detriment of immune complexes formed by bacteria and just one of the immunoglobulins (IgG or IgA). The study of intestinal luminal contents showed that those from DSS animals have a more potent opsonizing capacity, with significative influence of IgG and that are those differences and not microbiota changes what explain the different patterns detected between DSS and control fecal bacteria. IgG + IgA opsonized bacteria, fixed or viable, coming from DSS mice stimulated cytokine production such as IL-6, IL-10, TNF and nitrites in lamina propria extracted macrophages. Lastly, when lamina propria extracted macrophages were stimulated with commercial bacteria (*E. coli* pHrodo Green) opsonized with colonic luminal contents, this evidenced a clear partition between cells with high (CD64^{hi}) or intermediate (CD64^{int}) expression of CD64 marker. In every evaluated condition CD64^{hi} macrophages had the highest phagocytic capacity, meanwhile CD64^{int} cells, that had less phagocytic capacity, showed a significative increment in the bacteria uptake only when those were opsonized with DSS luminal content. The powerness of double opsonization may include stimulation through CD64 and Dectin-1 receptor. These results would demonstrate that in inflammatory conditions, when the mucosa exposure to luminal antigens is augmented, intestinal macrophages modulate CD64 expression, driving its polarization towards a restorative phenotype, with great phagocytic

capacity and cytokine release, that would help control the inflammation and repairing the tissue. In conclusion, this thesis work contributes to the knowledge of the CD64 marker function in colonic lamina propria macrophages showing that it is a functional receptor both in homeostatic and inflammatory contexts, capable of modulating depending on the tissue immunological requirements. These results highlight the plasticity of colonic lamina propria CD64+ macrophages in the complex scenario of the intestinal mucosa. On the other hand, the marked heterogeneity of the macrophagic subpopulations, differences in bacterial species and the composition of luminal fluids showed that further work to characterize these cells in each particular model in order to achieve a more precise and complete knowledge of the response that potential inflammatory stimulation might trigger.

La inmunidad intestinal y la microbiota

El tejido linfoide asociado al intestino, <GALT> (del inglés *gut associated lymphoid tissue*), es el mayor compartimiento inmune del organismo y la ruta principal de exposición a los antígenos (Ags) derivados de la dieta y de los microorganismos comensales que componen la microbiota. Si bien el componente bacteriano es el mejor caracterizado de la microbiota, el intestino también está colonizado por arqueas, bacteriófagos, virus, eucariotas unicelulares y hongos. Las bacterias se distribuyen formando un gradiente desde el yeyuno (10^3 microorganismos/g de contenido luminal) al colon, en donde alcanzan una densidad de 10^{10} – 10^{12} microorganismos/g de contenido luminal. Se cree que la exposición de los mamíferos a la microbiota comienza en el útero y se expande rápidamente después del nacimiento, etapa en la que la colonización oportunista por bacterias del entorno y otros factores ambientales como la dieta, puede afectar sustancialmente la entrada de microbios a los nichos mucosos (Gensollen y col., 2016). El período postnatal representa un momento potencialmente crítico en el que las exposiciones microbianas pueden tener profundas influencias en el desarrollo morfológico y funcional del sistema inmune (Mowat y col., 2014). Las células inmunes neonatales difieren en su función de las células inmunes adultas, ya que aprenden a tolerar el nuevo entorno generado después del nacimiento por la colonización con la microbiota comensal (El Aidy y col., 2013). El sistema inmune local se adapta y funciona en contacto con un ambiente en constante cambio. En este período, en la llamada "ventana de oportunidad", el sistema inmune es permisivo a la instrucción microbiana que resulta en una adecuada educación inmunológica y resistencia (o susceptibilidad) a la enfermedad en el futuro (El Aidy y col., 2013; Mowat y col., 2014). En humanos, las bacterias asociadas a la mucosa del intestino delgado distal y el colon pertenecen predominantemente a los filos *Bacteroidetes* (bacterias Gram negativas), *Firmicutes* (principalmente bacterias

Gram positivas), *Actinobacteria*, y en menor grado *Proteobacteria*, con distinto número de clases y géneros (Mondot y Lepage, 2016).

Entre el huésped y la microbiota comensal se establece un estado de mutualismo, donde las bacterias se benefician de las fuentes de energía provenientes de los alimentos en tanto que el metabolismo y la inmunidad del huésped son modulados por moléculas pequeñas, los metabolitos derivados de la actividad bacteriana, que se originan a partir de la dieta o la digestión de nutrientes o bien se sintetizan *de novo* por los microbios intestinales (Wang y col., 2019). En la inmunidad intestinal, los metabolitos son críticos tanto en la modulación de la homeostasis como en la función de las células inmunes innatas y adaptativas, y se han propuesto distintos mecanismos de acción (Postler y Ghosh, 2017). Las moléculas pequeñas difunden directamente a través de la capa de mucus y activan receptores específicos en el epitelio, estimulando programas transcripcionales que controlan la diferenciación, proliferación, maduración y funciones efectoras de muchas células inmunes (Postler y Ghosh, 2017). Entre éstos son relevantes los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) - acetato, propionato y butirato - que derivan de la digestión fermentativa de fibras por acción de enzimas bacterianas (Maslowski y Mackay, 2011). Los SCFAs se producen mayoritariamente en la porción inicial del colon (Tazoe y col., 2008) y actúan a través de receptores acoplados a proteína G, como el GPR43, expresado en células epiteliales, células enteroendócrinas (Karakci y col., 2007) y células de la inmunidad innata como neutrófilos y eosinófilos (Park y col., 2007), con profundos efectos en la homeostasis (Smith y col., 2013). Debido a la sumatoria de todos estos efectos, se considera que los microorganismos “educan” a las células inmunes innatas y adaptativas de la mucosa para favorecer mejores respuestas en encuentros microbianos futuros (Netea, 2014).

La inmunidad intestinal es compleja y depende de interacciones entre el epitelio, la microbiota y las células inmunes (Kaiko y Stappenbeck, 2014). La sofisticada regulación del GALT permite que el tracto digestivo funcione sin que se desarrolle un estado de inflamación franca (Garrett y col., 2010; Maloy y Powrie, 2011). Aunque la mayoría de las células inmunes que residen en el intestino presenta un estado activado, en condiciones fisiológicas la inducción de tolerancia es la respuesta de elección en este tejido. Desde muy temprano el huésped desarrolla mecanismos que mantienen la tolerancia oral y regulan la inflamación (Garrett y col., 2010). La alteración del balance de citoquinas en la mucosa es una de las causas del desarrollo de enfermedades intestinales inflamatorias (EII) crónicas, en las que la permeabilidad del epitelio se altera y se reclutan células activadas que provocan inflamación e injuria del tejido (Su y col., 2009). Es importante destacar que señales externas pueden modificar la reactividad del compartimiento inmune en la mucosa. Así por ejemplo, las respuestas inflamatorias sistémicas en las que hay abundante producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (Gauglitz y col., 2008) o IL-12 (Davidson y col., 1998; Pedrotti y col., 2016), constituyen potentes señales que perturban la homeostasis intestinal. Además, la microbiota o sus componentes antigénicos son claves en la iniciación, perpetuación o regulación de la respuesta inflamatoria crónica (Bäckhed, 2011; Maloy y Powrie, 2011). La función adecuada de la microbiota intestinal requiere una composición estable, por lo que grandes cambios en la relación de los filos, o la expansión de nuevos grupos bacterianos, conducen a un desequilibrio que se denomina disbiosis, con características cardinales como la reducción de la diversidad microbiana y el sobrecrecimiento de las proteobacterias (Walker y col., 2011). La disbiosis es distintiva de las EII pero también estaría asociada a trastornos metabólicos y neurológicos y a enfermedades autoinmunes (Weiss y Henet, 2017).

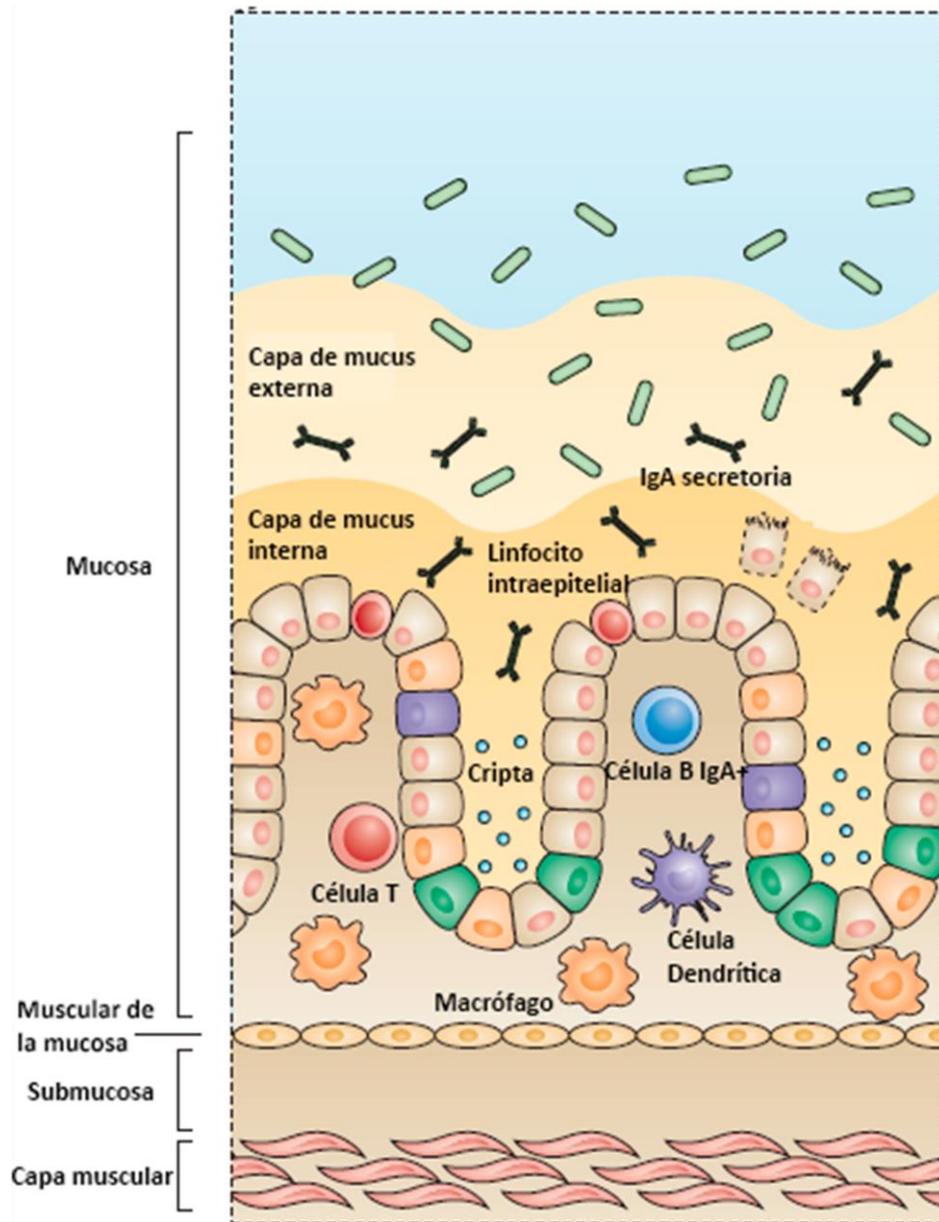


Figura 1. Esquema de la distribución anatómica del intestino grueso en el que se distinguen las diferentes capas con su respectiva composición celular y molecular. Adaptada de Mowat y col., 2014.

El tracto intestinal comprende distintas regiones con características anatómicas y fisiológicas particulares y notables similitudes entre ratones y humanos (Mowat y col., 2014). La mayoría de los procesos inmunológicos tiene lugar en la mucosa, que comprende el epitelio, la lámina propia (LP) subyacente y la muscular de la mucosa, una capa muscular fina situada debajo de la LP.

Colectivamente, la LP intestinal y el epitelio contienen la mayor población de células T, células plasmáticas y macrófagos (MØs) del organismo. Debido a que la composición y la densidad de la microbiota varían enormemente entre los diversos sitios intestinales, estas diferencias también ocasionan efectos específicos en la configuración regional de las poblaciones de células inmunes (Mowat y col., 2014). En el caso particular del colon (**Fig. 1**), posee diferencias estructurales y funcionales con el intestino delgado: la anatomía colónica carece de vellosidades y borde en cepillo, lo cual explica la escasa función digestiva llevada a cabo en este segmento cuya principal función es la reabsorción de agua y la eliminación de desechos. En la profundidad de las criptas, el colon posee menor cantidad de células de Paneth, productoras de péptidos antimicrobianos como lisozima y defensinas que el intestino delgado; por otra parte, la proporción de células goblet productoras de mucus, se incrementa desde el duodeno superior a la porción más distal del colon. La capa de mucus que protege la superficie del epitelio intestinal, en el colon tiene una organización bien definida que se compone de una capa interna densa, relativamente estéril y una capa externa laxa, que es el hábitat de algunas familias de bacterias comensales (Johansson y Hansson, 2013). La capa interna representa un primer mecanismo de defensa altamente eficiente ya que por su alta densidad evita la penetración de la mayoría de las bacterias y aísla el epitelio de la microbiota luminal. Estudios en ratones libres de gérmenes han demostrado que las bacterias tienen un gran impacto en la formación de la capa mucosa ya que estos huéspedes muestran menos células goblet, una capa de moco más delgada, niveles alterados de citoquinas e inmunoglobulinas (Igs) y son más vulnerables a las infecciones (Dieterich y col., 2018). Recientemente se ha descrito que en un mismo bioterio y en diferentes habitaciones, los ratones pueden tener microbiotas ligeramente distintas que afectan la barrera mucosa del colon y que se transmiten a la descendencia (Jakobsson y col., 2015). Así, ratones C57BL/6, provenientes de

distintos proveedores presentan similar grosor y producción de mucus, pero los alojados en una dada habitación mostraron la capa interna impenetrable a las bacterias, de manera comparable a lo observado en ratones presentes en la naturaleza. En los ratones C57BL/6 de otra habitación, la capa de mucus fue más penetrable, favoreciendo el contacto de bacterias con el epitelio y la persistencia de un tono inflamatorio sostenido en colon (Jakobsson y col., 2015). Además de actuar como una barrera física, el mucus representa una matriz rica en glicoproteínas, como la mucina, a la cual se adhiere la IgA secretoria (IgAs) y bacterias unidas a IgAs. En efecto, en colon humano y de ratón se ha demostrado con técnicas de inmunofluorescencia que la IgAs está anclada en la capa externa de mucus a través de interacciones combinadas con mucina y bacterias intestinales (Rogier y col., 2014), formando una especie de escudo que protege contra los patógenos y al mismo tiempo estabiliza a los microbios comensales.

Inmunoglobulinas (Igs) presentes en el intestino

El isotipo IgA es el anticuerpo dominante en el intestino del ratón (Weisz-Carrington y col., 1977; Macpherson y col., 2008). La IgA dimérica producida en la lámina propia es transportada a la luz intestinal por el receptor de inmunoglobulinas polimérico, lo que limita el acceso microbiano al epitelio intestinal (Cerutti y Rescigno, 2008). Las células secretoras de IgA se pueden generar en presencia o ausencia de células T. La activación de receptores inmunes innatos en células B (por ejemplo receptores de tipo toll, TLRs) por ligandos microbianos promueve respuestas T independientes que resultan en la producción de anticuerpos IgA de baja afinidad específicos para una amplia gama de especies comensales (Fagarasan y col., 2010; Pabst, 2012). Por el contrario, la respuesta de IgA T dependiente de alta afinidad, es estimulada por patógenos entéricos y microbios con propiedades únicas (Pabst, 2012; Bunker y col., 2015). Los análisis de

anticuerpos en ratones sugieren que la respuesta específica contra comensales es predominantemente del isotipo IgA (Macpherson y col., 2000; Slack y col., 2009; Harmsen y col., 2012). Sin embargo, reportes recientes muestran que ratones sanos pueden generar anticuerpos IgG contra la microbiota de manera T-dependiente y esta respuesta es productiva ya que contribuye a evitar la translocación y diseminación de bacterias (Zeng y col., 2016). Clásicamente, la IgG ha sido asociada con respuestas pro-inflamatorias sistémicas, pero numerosa evidencia ha mostrado que, en adultos, la producción constitutiva de IgG antimicrobiana en el tracto gastrointestinal es una característica del estado homeostático y cumple funciones en la maduración de células del sistema inmune y en la defensa ante infecciones (Kamada y col., 2015; Gómez de Agüero y col., 2016; Koch y col., 2016; Ohsaki y col., 2017). En modelos de colitis, cuando los ratones son tratados con dextran sulfato de sodio (DSS) que daña el epitelio del colon y desencadena bacteriemia, el contenido de IgG en el fluido intestinal, así como la proporción de bacterias comensales “decoradas” (recubiertas, unidas u opsonizadas) con IgG, incrementan significativamente (Zeng y col., 2016). En el mismo sentido, utilizando otros modelos, se demostró la producción de IgG2b e IgG3 reactiva contra la microbiota de manera T independiente a través de la señalización vía TLR en las células B (Koch y col., 2016). Estos mismos autores describen que la IgG presente en la leche materna sería crítica en la etapa posnatal ya que participaría en el establecimiento de poblaciones regulatorias. En particular, la IgG podría favorecer la fagocitosis de los microbios entéricos por los MØs intestinales con una rápida eliminación no inflamatoria. Por ejemplo, después de la infección con *Citrobacter rodentium* se producen anticuerpos IgG que se unen a las bacterias localizadas en el epitelio y facilitan su destrucción por neutrófilos en la LP (Kamada y col., 2015). De manera interesante, la transferencia de IgG materna asociada a fragmentos microbianos promueve en el colon de las crías el aumento

de MØs F4/80+CD11c+, así como de células linfoides innatas tipo 3 (Gómez de Agüero y col., 2016). Estos hallazgos muestran que es necesario re-evaluar el rol de la IgG en la inmunidad del tracto gastrointestinal, un sistema tradicionalmente asociado con IgA, a fin de establecer su contribución en la homeostasis y la patología (Castro-Dopico y col., 2019). Modelos matemáticos reportados muy recientemente muestran que, si bien la IgA es en general el isotipo más potente para detener la penetración bacteriana por poseer 4 dominios de unión a Ags capaces de aglutinar eficientemente a las bacterias, la IgG podría representar una alternativa para el atrapamiento de patógenos altamente móviles en las superficies mucosas (Xu y col., 2019). A pesar de todas estas evidencias, el mecanismo por el cual la IgG entraría al lumen es especulativo (Kamada y col., 2015; Zeng y col., 2016) y tampoco se conoce qué efectos podrían tener los complejos inmunes (CIs) IgG-Ags luminales sobre poblaciones fagocíticas de la LP del intestino.

Macrófagos intestinales

En la LP del colon, el principal sitio efector de la mucosa, residen poblaciones de linfocitos T activados, células de memoria, células plasmáticas productoras de IgA e IgG, células cebadas, células dendríticas y MØs. Estos últimos representan la población leucocitaria más abundante que deriva de precursores llegados desde la sangre. El mecanismo que mantiene el compartimento de los MØs del colon refleja un cambio único que pasa de la proliferación local de precursores en la etapa neonatal al reabastecimiento por los monocitos sanguíneos Ly6C^{hi} en la vida adulta (Bain y col., 2014). Las células recientemente emigradas adquieren propiedades particulares en la LP al ser estimuladas por mediadores derivados de las células epiteliales como TGF- β , IL-10, linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), prostaglandinas o el ácido retinoico derivado de la vitamina A (Bain y col., 2013). Además, estos MØs son grandes productores de IL-10, lo que contribuiría al

mantenimiento de células regulatorias recientemente ingresadas a la LP (Hadis y col., 2011). La inflamación local puede provocar la disrupción del mecanismo de cascada descrito para explicar la maduración de monocitos que migran al intestino desde la médula ósea/sangre y la alteración de las poblaciones residentes (Bain y col., 2013). La producción sostenida de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas provoca la movilización de monocitos desde la médula ósea (MO) a la sangre, y su posterior reclutamiento al intestino inflamado (Maloy y Powrie, 2011). Si como consecuencia de la inflamación sistémica, estas células mieloides frescas no tienen ningún condicionamiento previo por parte del epitelio o de citoquinas con potencial *tolerogénico*, su reactividad frente a la estimulación con Ags del lumen puede resultar exacerbada (Maloy y Powrie, 2011; Pedrotti y col., 2017).

Los MØs son células altamente plásticas y su función puede ser modulada por el microambiente local. Si bien existen distintas subpoblaciones de MØs, la principal categorización incluye los pro-inflamatorios clásicos (M1) inducidos por estímulos como el interferón (IFN γ) y los alternativos (M2). Las poblaciones de MØs maduros no están completamente polarizadas y pueden variar entre un fenotipo anti- o pro-inflamatorio en 24 hs si son estimuladas adecuadamente (Krausgruber y col., 2011). Es decir que diferencias en el microambiente podrían afectar el fenotipo y la función de los MØs. Numerosa evidencia identifica a la IL-6 como un potencial modulador de poblaciones de MØs en el ambiente intestinal (Mauer y col., 2014; Fernando y col., 2014) favoreciendo la diferenciación hacia un fenotipo anti-inflamatorio con potencial de restaurar heridas (Norton y col., 2016). Más aún, un microambiente con elevadas concentraciones de IL-6 se asociaría a MØs CD163+ CD64+ propios de un fenotipo con características anti-inflamatorias (Porcheray y col., 2005). Sin embargo, otros autores proponen que la IL-6 actúa como una señal accesoria capaz de mantener el desarrollo del fenotipo comprometido por señales como IL-4+IL-13 (M2) o IFN γ (M1) derivadas del

microambiente, condicionando el escenario para la resolución o la amplificación de la inflamación (Fernando y col., 2014).

Los MØs del colon en particular, participan de la homeostasis a través de diferentes mecanismos: remueven células apoptóticas y debris, contribuyen a la reparación del epitelio (Smith y col., 2011) e inhiben la cascada inflamatoria del factor de transcripción NF-κB (Platt y Mowat, 2008). Los MØs residentes fagocitan bacterias que han invadido la LP intestinal, como típicamente ocurre con los MØs tisulares, pero a diferencia de estos últimos, responden pobremente a estímulos inflamatorios con escasa liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Smythies y col., 2005). Comparten también características de las células fagocíticas como la capacidad endocítica, la abundancia de enzimas citoplasmáticas como hidrolasas lisosomales y estererasas y la expresión de receptores fagocíticos (receptores de la porción Fc de inmunoglobulinas y del complemento). Debido a su biología tan dinámica, la membrana plasmática de los MØs sufre continuas modificaciones como consecuencia de los procesos de fusión que ocurren durante la endocitosis o la fagocitosis, lo que puede afectar la expresión de moléculas empleadas en la fenotipificación (Dos Anjos Cassado, 2017). Entre los marcadores más utilizados para caracterizar estas células se cuentan F4/80, CD11b (también conocido como Mac-1), receptores de complemento (CR3), el receptor de la fractalquina (CX3CR1) y los antígenos de histocompatibilidad tipo II (CMH-II) (Platt y Mowat, 2008; De Calisto y col., 2012; Bain y col., 2013). La molécula F4/80 es una glicoproteína de 160 kDa con un dominio extracelular similar al del factor de crecimiento epitelial (EGF) y un motivo de siete dominios de transmembrana similares a los observados en receptores acoplados a proteínas G (McKnight y Gordon, 1996). La expresión de F4/80 está fuertemente regulada por la ubicación celular, las interacciones con otras células, la etapa de diferenciación y el perfil de activación (Gordon y col., 1992). Esta molécula podría tener funciones en la adhesión celular e influir en la

distribución tisular, el desarrollo y la función *in vivo* (Dos Anjos Cassado, 2017). Una cepa de ratones en la cual se deletó el gen de F4/80 por la técnica de la recombinasa Cre mostró un desarrollo normal, lo que indica que la expresión de F4/80 en MØs es prescindible; es interesante destacar que estos ratones no pudieron suprimir una respuesta específica de Ag en un modelo de tolerancia oral, lo que sugiere que MØs F4/80+ tendrían un rol relevante en la inmunidad de mucosas (Lin y col., 2005).

Los MØs del colon además tienen una expresión escasa o nula de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) moleculares de patógenos lo que favorecería la pobre respuesta inflamatoria. Por el contrario, tienen altos niveles de expresión de receptores como GPR35, que reconoce el ácido kinurénico derivado del metabolismo del triptófano, GPR120, que reconoce SCFAs y de los receptores purinérgicos P2Y y P2X (Steinert y col., 2016). Como algunas subpoblaciones de MØs se localizan por debajo del epitelio y emiten proyecciones al lumen, se cree que estos receptores permitirían sensor productos de la actividad metabólica de la microbiota (Niess, 2010). Además, GPR35 es el receptor de la quimiocina CXCL-17 producida por el estroma intestinal, por lo que se ha sugerido que participaría en la localización anatómica de los MØs intestinales (Maravillas-Montero y col., 2015).

Receptores de la IgG

En los últimos años se propuso al receptor de alta afinidad de la cadena γ de la IgG (Fc γ RI/CD64) como un marcador de linaje para MØs intestinales, pero no así para los que residen en otros tejidos (Tamoutounour y col., 2012). Los Fc γ Rs son glicoproteínas de superficie celular que se unen a la porción Fc de los anticuerpos IgG. Se expresan ampliamente en células del sistema inmune, y son responsables de mediar las funciones celulares efectoras de la IgG, incluyendo la migración y maduración de células inmunes, la producción de mediadores inflamatorios y la

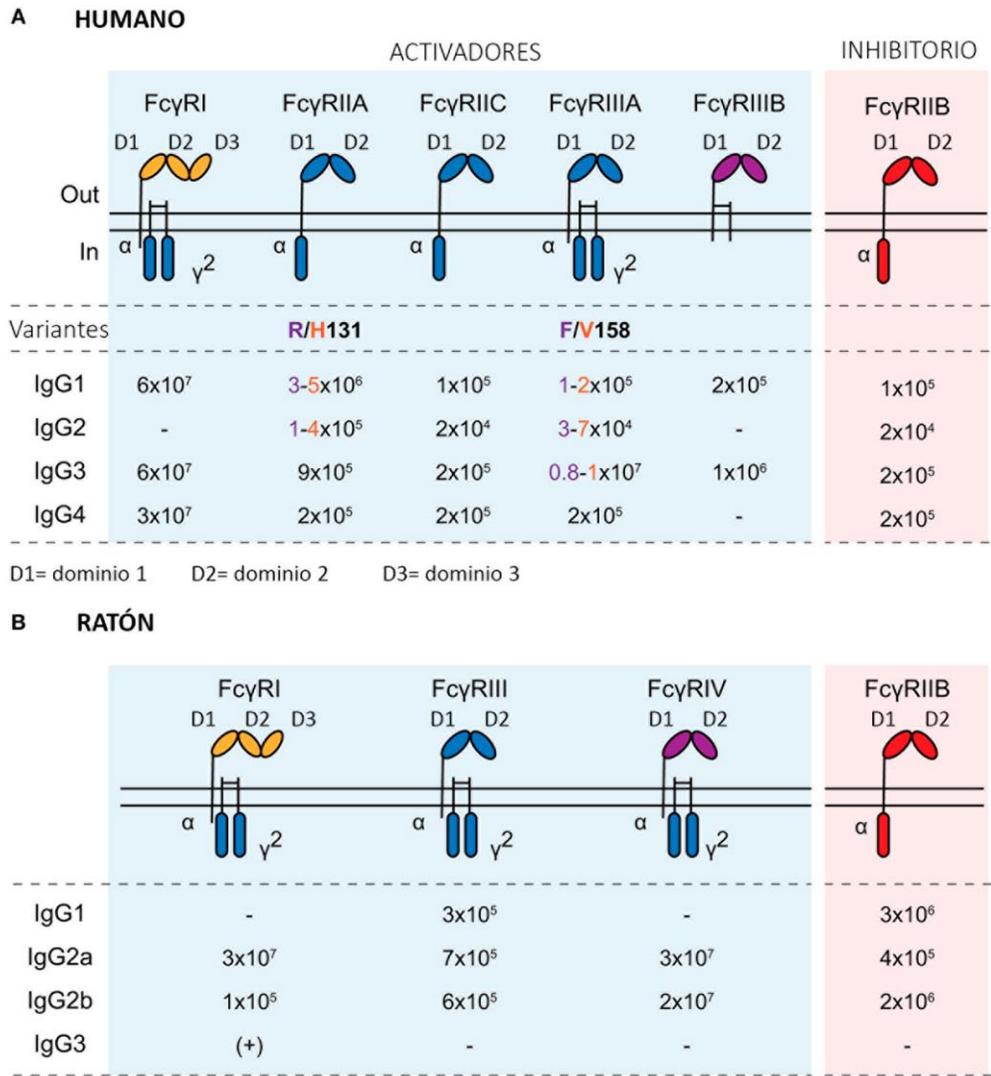


Figura 2. Los diversos receptores de la porción Fc de IgG en humano y en ratón, activadores e inhibitorios, con sus respectivas afinidades (M^{-1}). Adaptada de Castro-Dopico y col., 2019.

eliminación de microbios opsonizados. Existen varios FcγRs activadores en humanos (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA y FcγRIIIB) y en ratón (FcγRI, FcγRIII y FcγRIV), y sólo un receptor inhibitorio tanto en humanos como en ratón, FcγRIIB (**Fig. 2**). La mayoría de estos receptores tiene una afinidad baja a media por IgG, mientras que el receptor **FcγRI o CD64**, exhibe la mayor afinidad por la inmunoglobulina (Hulett y Hogarth, 1998). La alta afinidad de CD64 hacia IgG demuestra su papel fundamental en iniciar y activar la respuesta efectora celular incluso a bajas concentraciones de IgG (Akinrinmade y col., 2017). A diferencia de CD64, otros

receptores Fc sólo internalizan complejos con IgG que opsonizan Ags multivalentes. Recientemente, se ha resuelto la estructura cristalina del CD64 humano que consta de tres dominios extracelulares (D1, D2 y D3, **Fig. 2**), una región transmembrana y un dominio citoplasmático (Kiyoshi y col., 2015). Los ángulos en bisagra localizados entre los dominios D1 a D3 conforman un singular bolsillo hidrofóbico que se adapta perfectamente al Fc de la IgG humana y le confiere la alta afinidad de unión por esta inmunoglobulina. Esta estructura no se genera con los receptores Fc γ de baja afinidad que sólo presentan los dominios D1 y D2 (Lu y col., 2011).

Utilizando anticuerpos dirigidos contra las moléculas CMH-II, CD11c y CD64 es posible distinguir sin ambigüedad las poblaciones de células dendríticas y M ϕ s residentes en la LP (De Calisto y col., 2012). El CD64 es inducido por citoquinas como IFN- γ o IL-10, mientras que la IL-4 suprime su expresión y por lo tanto los niveles locales de estos mediadores podrían modular la expresión y la función de este marcador en poblaciones del intestino. Por otra parte, los CIs podrían promover el entrecruzamiento de la molécula CD64 favoreciendo la producción de IL-10 (Gallo y col., 2010). Alternativamente, anticuerpos IgG podrían actuar sobre receptores Fc γ o CR3 presentes en las células fagocíticas modulando su capacidad inmunoestimuladora ya que algunos isotipos se unen tanto a receptores Fc de activación como de inhibición (Bruhns y Jönsson, 2015). Existen múltiples líneas de evidencia que sugieren el papel crítico de la IgG y su señalización a través de Fc γ R en la patogénesis en EII (**Fig. 3**). Estas enfermedades están ampliamente asociadas con variantes genéticas y factores de riesgo tales como infecciones con micobacterias. Concretamente, estudios genéticos demuestran que la variante de baja afinidad Fc γ RIIA-R131 es protectora en colitis ulcerativa en varias cohortes de pacientes independientes (Jostins y col., 2012). La inducción sistémica y local de IgG anti-comensales y auto-anticuerpos, tales como los anti-citoplasma de neutrófilos perinucleares (pANCA) se observó en pacientes con EII,

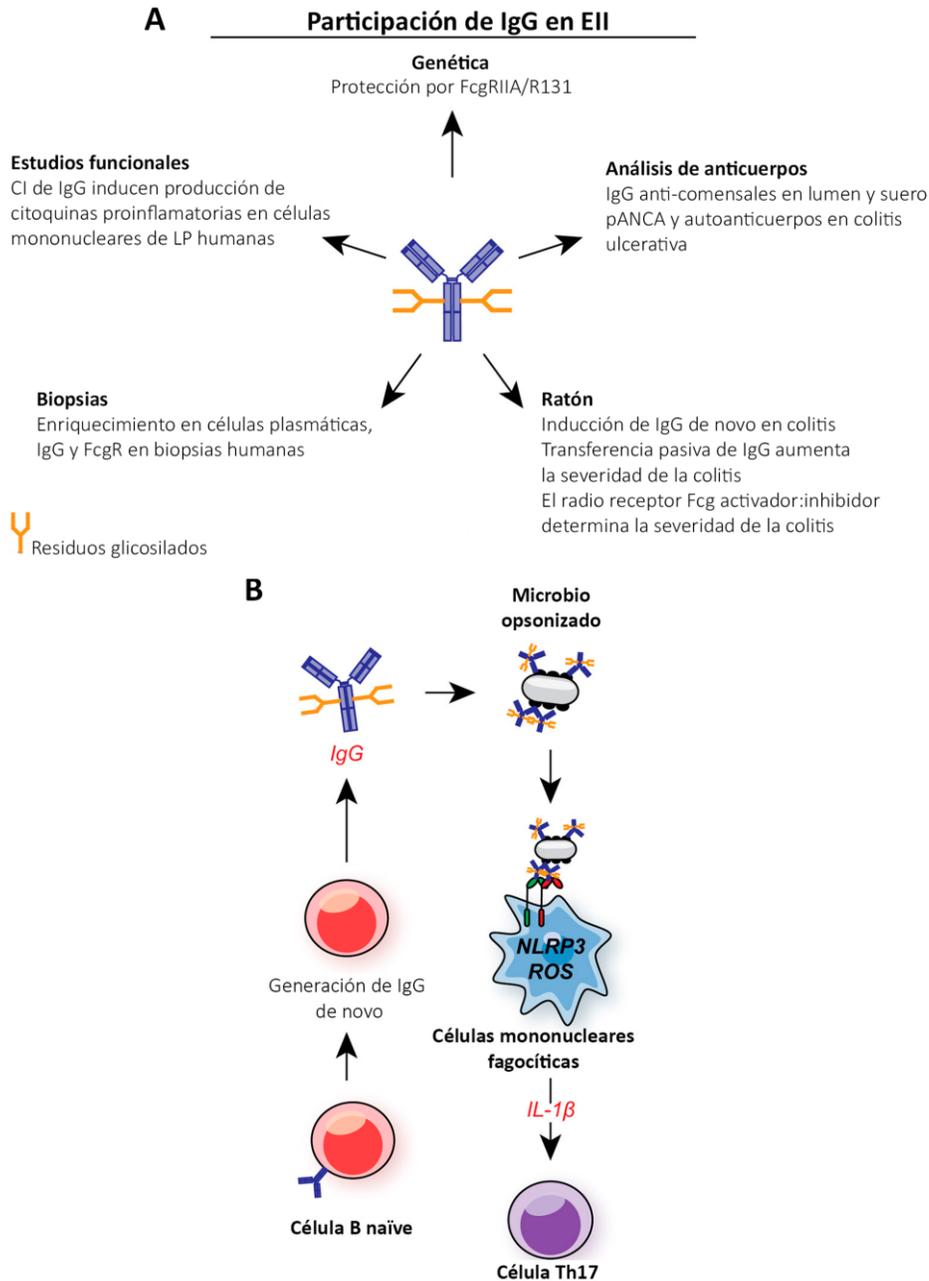


Figura 3. (A) Participación de la IgG en la mucosa intestinal y en EII. **(B)** Secuencia de eventos que ocurren en EII. Adaptada de Castro-Dopico y col., 2019

mientras que células plasmáticas IgG⁺ y células que expresan FcγR están enriquecidas en biopsias intestinales de pacientes con EII activas (Teegen y col., 2009). Además, células plasmáticas IgG⁺ infiltran la LP de animales tratados con DSS e interaccionan con MØs CD64⁺, los cuales luego de la estimulación con CIs conteniendo IgG, liberan citoquinas que podrían influenciar los niveles de la

proteína C reactiva (Lin y col., 2019). En estudios murinos, la intensidad de la señalización a través del FcγR determina la magnitud de la inflamación intestinal y de la inducción de inmunidad Th17 dependiente de IL-1β (Kobayashi y col., 2009); además, la transferencia pasiva de IgG anti-flagelina a animales controles no estimulados (naïve) exacerbó la colitis inducida por DSS (Castro-Dopico y col., 2019). En humanos, CIs conteniendo IgG-anti-bacterias comensales se unen a MØs residentes de intestino que expresan FcγR, induciendo la producción de IL-1β y quimiocinas que reclutan neutrófilos (Castro-Dopico y col., 2019). Además, los anticuerpos anti TNFα usados para el tratamiento de EII (por ejemplo Infliximab) se unirían por su porción Fc a la molécula CD64 estimulando la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Wojtal y col., 2012). Estudios recientes han demostrado que en humanos una variante del receptor activador FcRγIIA, que posee baja afinidad por IgG, confiere protección contra el desarrollo de colitis ulcerativa (Castro-Dopico y col., 2019). En conjunto estas evidencias con efectos tanto inflamatorios como protectivos han despertado el interés por la re-evaluación del papel de la IgG y sus receptores en la inmunidad del tracto gastrointestinal. La caracterización de un repertorio de IgG asociada a EII y los mecanismos celulares a través de los cuales podría contribuir a la patogénesis de las mismas son aún inciertos. Por otra parte, pacientes con colitis ulcerativa poseen hasta un 80% de bacterias comensales opsonizadas con IgG, en contraste con pacientes controles, donde menos del 10% de las mismas están cubiertas por IgG. No obstante, la contribución de los anticuerpos IgG a la inmunidad intestinal ha sido menos caracterizada debido a la predominancia de IgA en las superficies mucosas, aunque, en este sentido, algunos autores han descrito experimentos de transporte donde las tres clases de inmunoglobulinas (con un 2,7% de IgG) cruzaron la barrera intestinal de conejo e ingresaron al lumen, encontrándose hasta un 2,9% de actividad anti-toxina (Batty y Bullen, 1961; Wernet y col., 1971).

Objetivos

En base a todo lo descrito anteriormente, el OBJETIVO GENERAL de este trabajo de Tesis fue **caracterizar la contribución de la población de MØs CD64+** en la homeostasis intestinal. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar el fenotipo y función de MØs CD64+ aislados de la LP de intestino grueso de ratones en distintas condiciones experimentales.
- 2) Evaluar el fenotipo y función de Mφ derivados de MO bajo distintos estímulos *in vitro*.
- 3) Evaluar el efecto de señales exógenas en la expresión de la molécula CD64.

Resultados

En líneas generales, en esta Tesis Doctoral se utilizaron 2 estrategias experimentales para la obtención de MØs (**Fig. 4**).

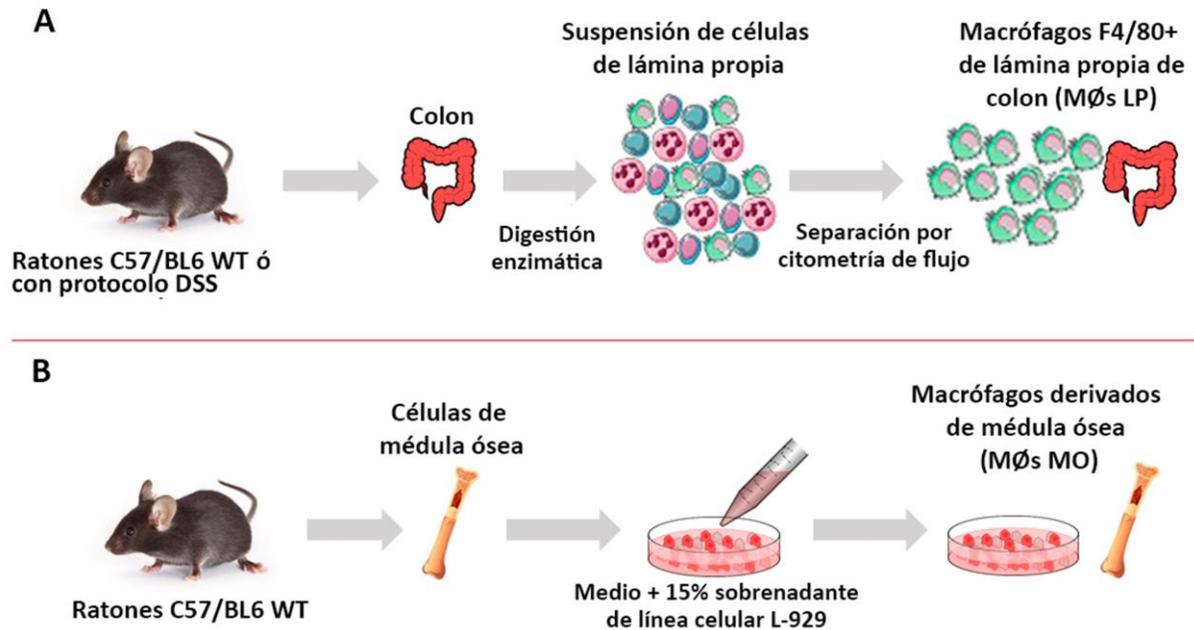


Figura 4. Estrategias experimentales utilizadas para la obtención de MØs de LP de colon y de médula ósea. A) Modelo *ex vivo*. Se realizó una digestión enzimática de la lámina propia del colon de ratones WT o con protocolo DSS y la suspensión celular resultante se trató con anticuerpos anti-F4/80. Posteriormente se realizó una purificación por citometría de flujo. **B)** Modelo *in vitro*. Se aislaron células de médula ósea obtenida del fémur de ratones WT. Estas fueron tratadas con medio de cultivo suplementado con 15% de sobrenadante de la línea celular L-929 por 6 días. Para mayores detalles metodológicos referirse a Materiales y Métodos.

En una primera etapa, utilizando el modelo *ex vivo* (**Fig. 4A**), se evaluó en condiciones homeostáticas, la frecuencia y la intensidad de expresión de la molécula CD64 y otros marcadores del linaje monocito/MØ, como F4/80, Ly6c y CMH-II en células totales de la LP del colon utilizando citometría de flujo. Se estandarizó la estrategia de análisis (dispersión del láser hacia adelante y lateral, FCS vs. SSC y singletes) y se seleccionó la molécula F4/80 como marcador de linaje macrófágico (**Fig. 5A**). Los resultados obtenidos muestran que aproximadamente el 40% de las células F4/80+ de la LP del colon expresan CD64 y Ly6c en su superficie (**Fig. 5B**), mientras que cerca del 55% son CMH-II positivas, con niveles comparables

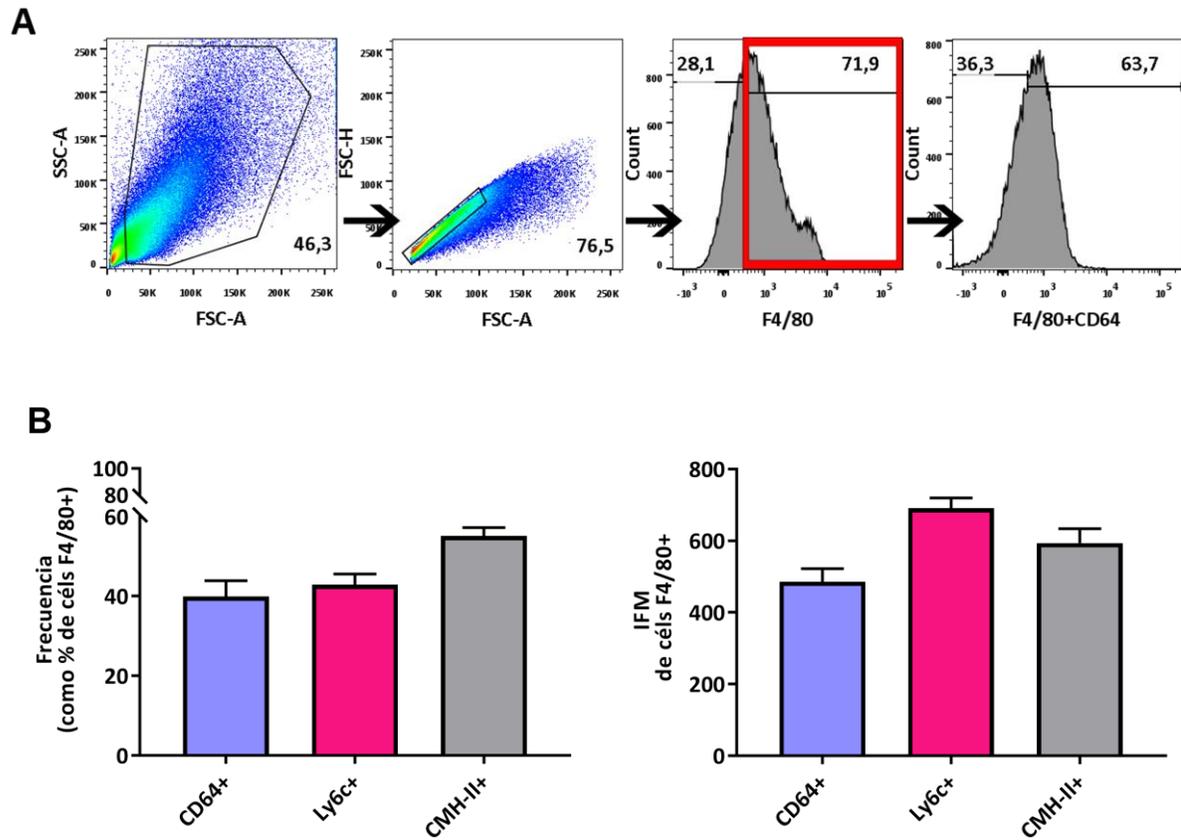


Figura 5. Marcadores CD64, Ly6c y CMH-II en células F4/80+ de LP colónica en condiciones homeostáticas en ratones C57BL/6. A) Estrategia de análisis utilizada en los experimentos de citometría de flujo; muestra representativa con selección de la población (FSC vs. SSC), selección de singletes y de células F4/80+; **B)** Frecuencia e IFM de expresión de CD64, Ly6c y CMH-II. Los datos son medias \pm SEM (n=5) de 2 experimentos similares.

de expresión de estas moléculas, evaluada como intensidad de fluorescencia media (IFM).

A continuación, se comparó la expresión de CMH-II y CD64 en células F4/80+ extraídas de otros órganos linfoides (**Fig. 6**); se observó una proporción similar de células F4/80+CMH-II+ entre los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) que drenan la mucosa y la LP; en tanto que, en los ganglios linfáticos inguinales (GLI), la frecuencia fue menor comparada con la LP ($p < 0,05$) (**Fig. 6A, izquierda**). De los tres sitios analizados, la LP mostró una leve disminución en la expresión de moléculas del CMH-II ($p = 0,07$), lo que podría explicarse por los altos niveles de IL-10 presentes en la mucosa intestinal (Thibodeau y col., 2008) (**Fig. 6A, derecha**).

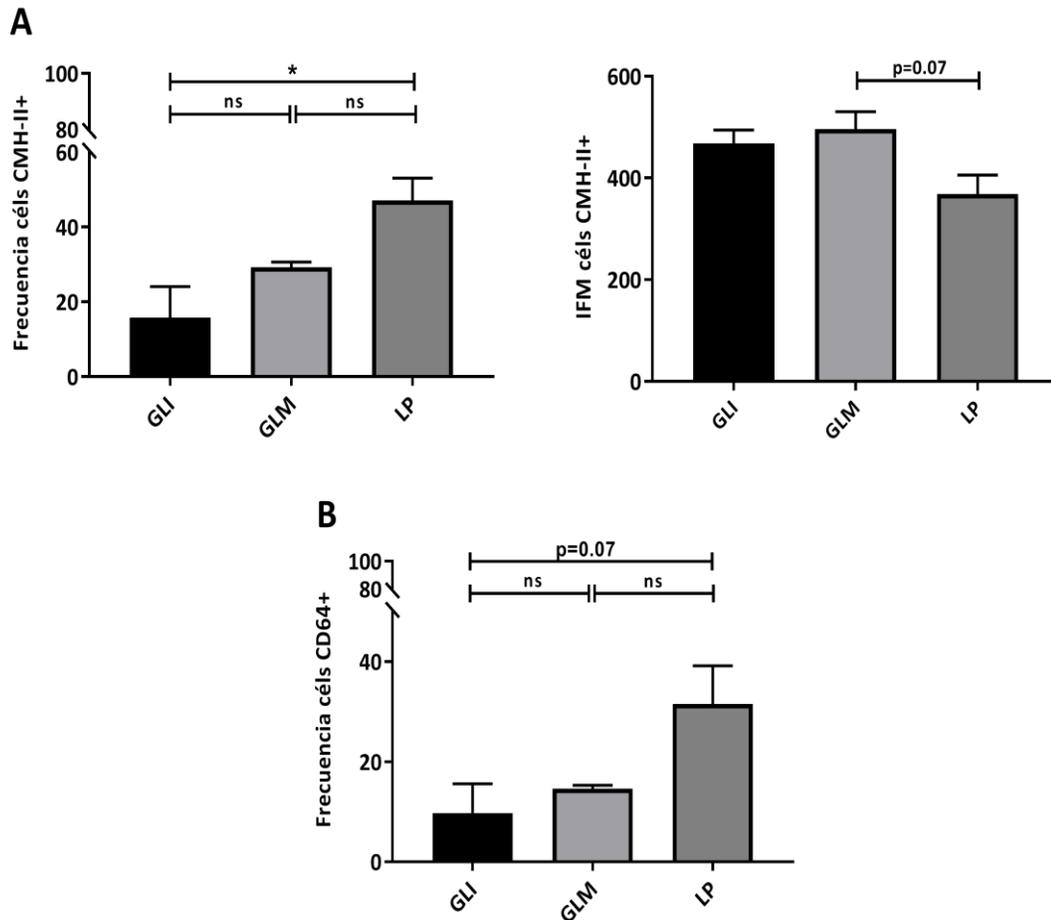


Figura 6. Análisis comparativo en condiciones homeostáticas de la frecuencia y expresión de células macrofágicas en GLI, GLM y LP de colon de ratones C57BL/6. Se seleccionaron células F4/80+ con la estrategia de “gate” descrita en la Fig. 2A a partir de 10^5 células adquiridas en el citómetro. **A)** Frecuencia (%) y expresión (IFM) de CMH-II. **B)** Frecuencia (%) de CD64. Los datos son medias \pm SEM (n=5) de 2 experimentos similares; * p<0,05.

Además, se observó que en la LP del colon, la frecuencia de células CD64+ fue ligeramente mayor que en los GLI (p=0,07) y similar a la de los GLM (**Fig. 6B**).

El epitelio que recubre la superficie interna del intestino puede verse afectado por una variedad de factores ambientales que van desde bacterias patógenas hasta medicamentos e irradiación. Las lesiones pueden producir la pérdida circunscrita del epitelio con formación de erosiones superficiales o úlceras más penetrantes, con la aparición local de inflamación, la inducción de una respuesta inmune innata y la resultante perturbación de la homeostasis (Mowat y col., 2017).

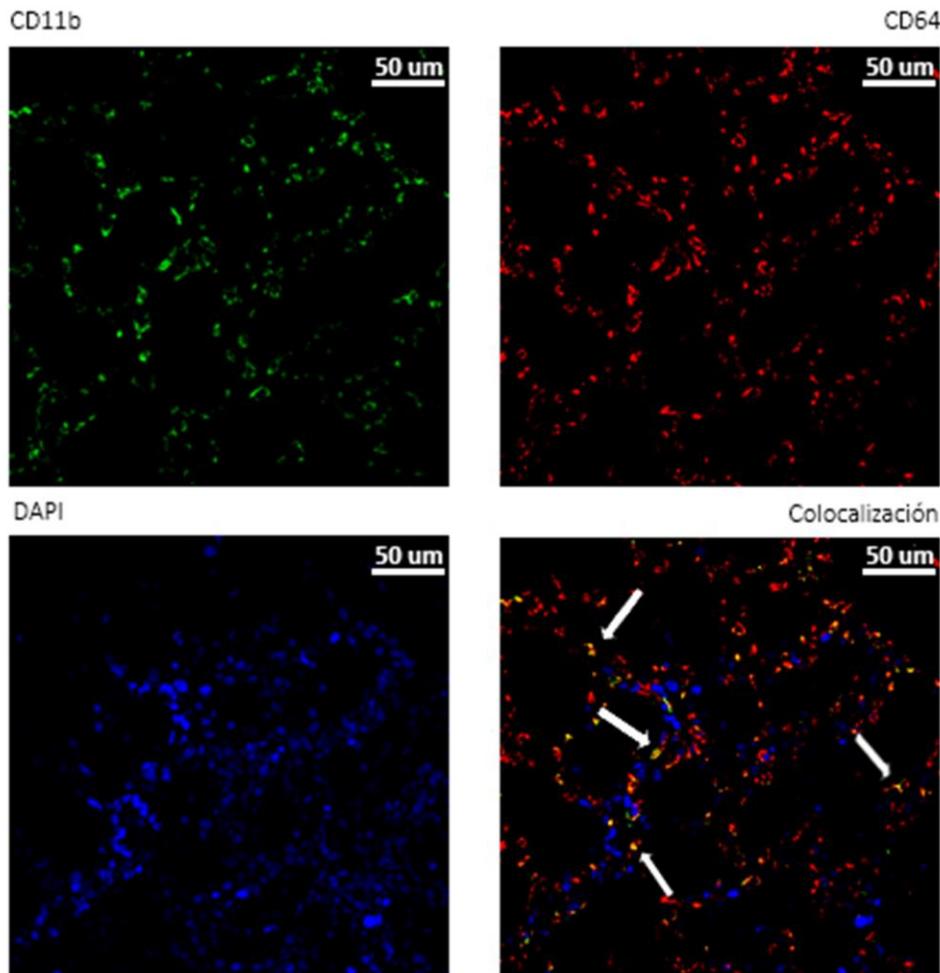


Figura 7. Localización de macrófagos CD64+ en la LP de colon en condiciones homeostáticas. Inmunofluorescencia de tejido entero en muestra de colon de animal control. Marcadores CD11b (verde), CD64 (rojo), DAPI (azul) y colocalización (flechas blancas). Cada imagen (Z stack) integra 4 planos focales distintos, desde más superficial a más profundo. Fotografía con aumento 40x representativa de 2 experimentos con n=3. Las imágenes se obtuvieron en un Microscopio Confocal Olympus FV1200.

Para caracterizar la distribución/localización de las células macrofágicas CD64+ de la LP en condiciones homeostáticas o en un contexto inflamatorio, se realizó la técnica de inmunofluorescencia de tejido entero “whole mount”, utilizando muestras de colon de ratones control o luego de 7 días del protocolo con DSS. Esta metodología es particularmente útil para el estudio de órganos con una gran área de superficie y diversidad regional, como es el tracto gastrointestinal (McDonald y Newberry, 2007). Además, los resultados obtenidos con esta técnica proporcionan información tridimensional sobre la ubicación de los antígenos sin la necesidad de reconstrucción a partir de secciones. Para realizarla, el colon distal de

ratones se abrió de manera longitudinal a lo largo de toda la estructura tubular, exponiendo así la superficie mucosa que se encuentra de cara a la luz intestinal. En estos experimentos se emplearon anticuerpos contra la integrina CD11b (**Figs. 7 y 8**), generalmente considerada un marcador de poblaciones mieloides para la identificación de MØs, el marcador macrofágico F4/80 (**Fig. 9**), el receptor CD64 (**Figs. 7-9**) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para colorear los núcleos. En condiciones homeostáticas, los MØs, identificados como puntos amarillos por la colocación de los marcadores CD11b (verde) y CD64 (rojo), mostraron un patrón de distribución homogéneo (**Fig. 7, flechas blancas**). En cuanto a la localización, estos MØs se encontraron dispuestos alrededor de las criptas de Lieberkühn, en este caso detectables como círculos vacíos, ya que desde la superficie no es posible visualizar el fondo de las mismas.

En las **Figuras 8 y 9** se muestran fotografías representativas del colon distal de animales control o con colitis, para las que se emplearon los marcadores CD64 y CD11b (**Fig. 8**) y CD64 y F4/80 (**Fig. 9**). Se agregó además un anticuerpo específico para EpCam, una molécula de unión celular epitelial (verde) y DAPI (azul). En ambas figuras se observan las criptas de Lieberkühn como círculos vacíos y los MØs en color rosado/anaranjado debido a la colocación de CD64 con CD11b o F4/80, según corresponda. Con los dos marcadores de MØs utilizados, en las muestras control la distribución de MØs CD64+ fue homogénea y en estrecho contacto con el epitelio, similar a lo que se describió en la Figura 7. Sin embargo, en animales con colitis, el patrón de distribución de los MØs cambió notablemente, con una localización en agregados que coincidieron con áreas de destrucción masiva de la mucosa y con pérdida del epitelio. Estos hallazgos coinciden con resultados previos del grupo de trabajo, obtenidos con microscopía óptica convencional de secciones de colon teñidas con hematoxilina y eosina el día 7 del protocolo de DSS en los que el tejido mostró úlceras a nivel del epitelio intestinal, pérdida de la arquitectura

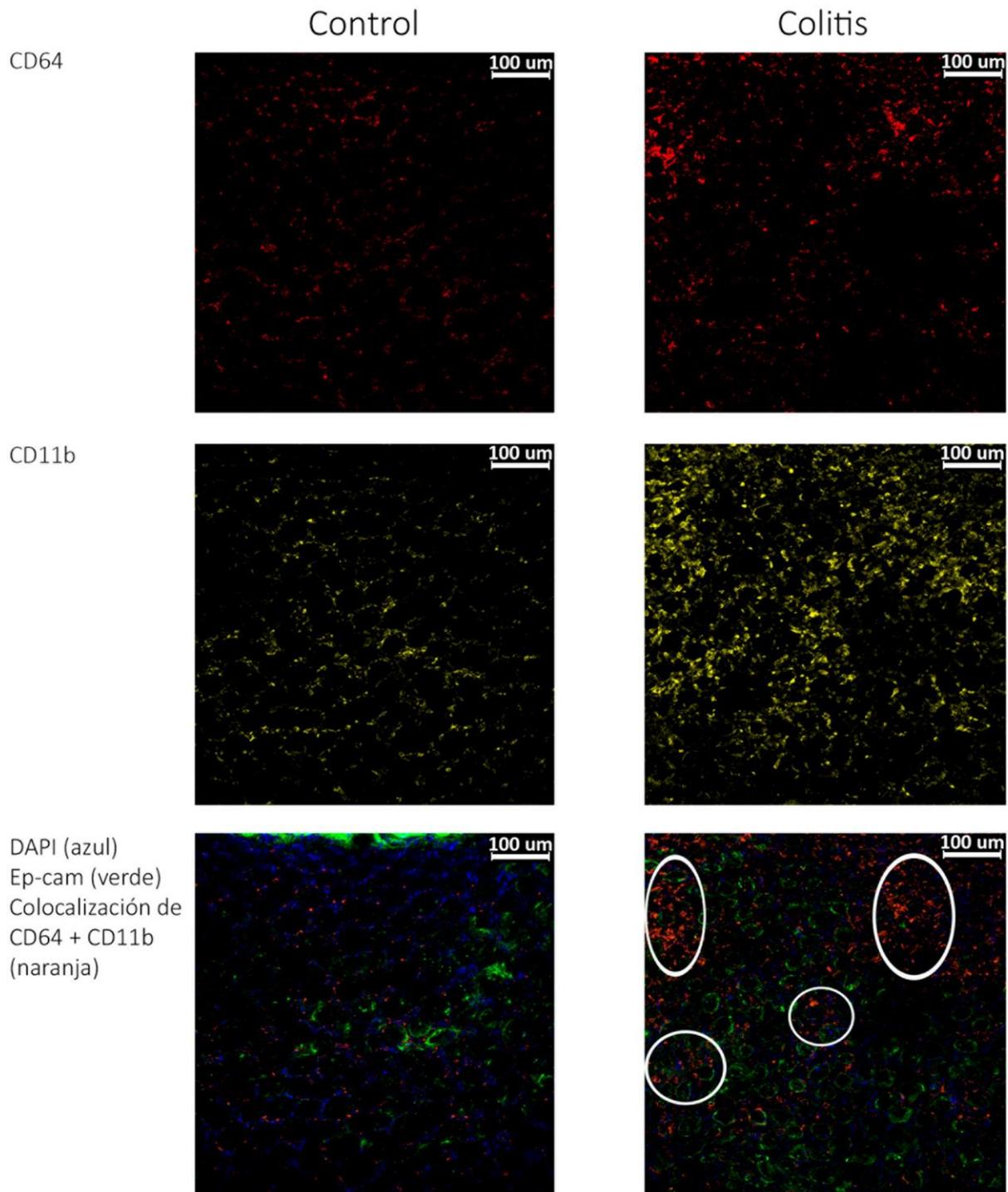


Figura 8. Localización de macrófagos CD64+CD11b+ en la LP de colon en condiciones inflamatorias. Inmunofluorescencia de tejido entero en muestras de colon de animales control (izquierda) o DSS (derecha). Marcadores DAPI (azul), Ep-Cam (verde), CD64 (rojo) y CD11b (amarillo). En las figuras inferiores se muestra la colocalización de CD64 y CD11b (naranja). Las elipses blancas indican las zonas de focos inflamatorios en muestras de animales colitis, a diferencia del patrón homogéneo en muestras de animales control. Cada imagen (Z stack) integra 4 planos focales distintos, desde más superficial a más profundo. Fotografías con aumento 20x representativas de 2 experimentos con n=3/grupo. Las imágenes se obtuvieron en un Microscopio Confocal Olympus FV1200.

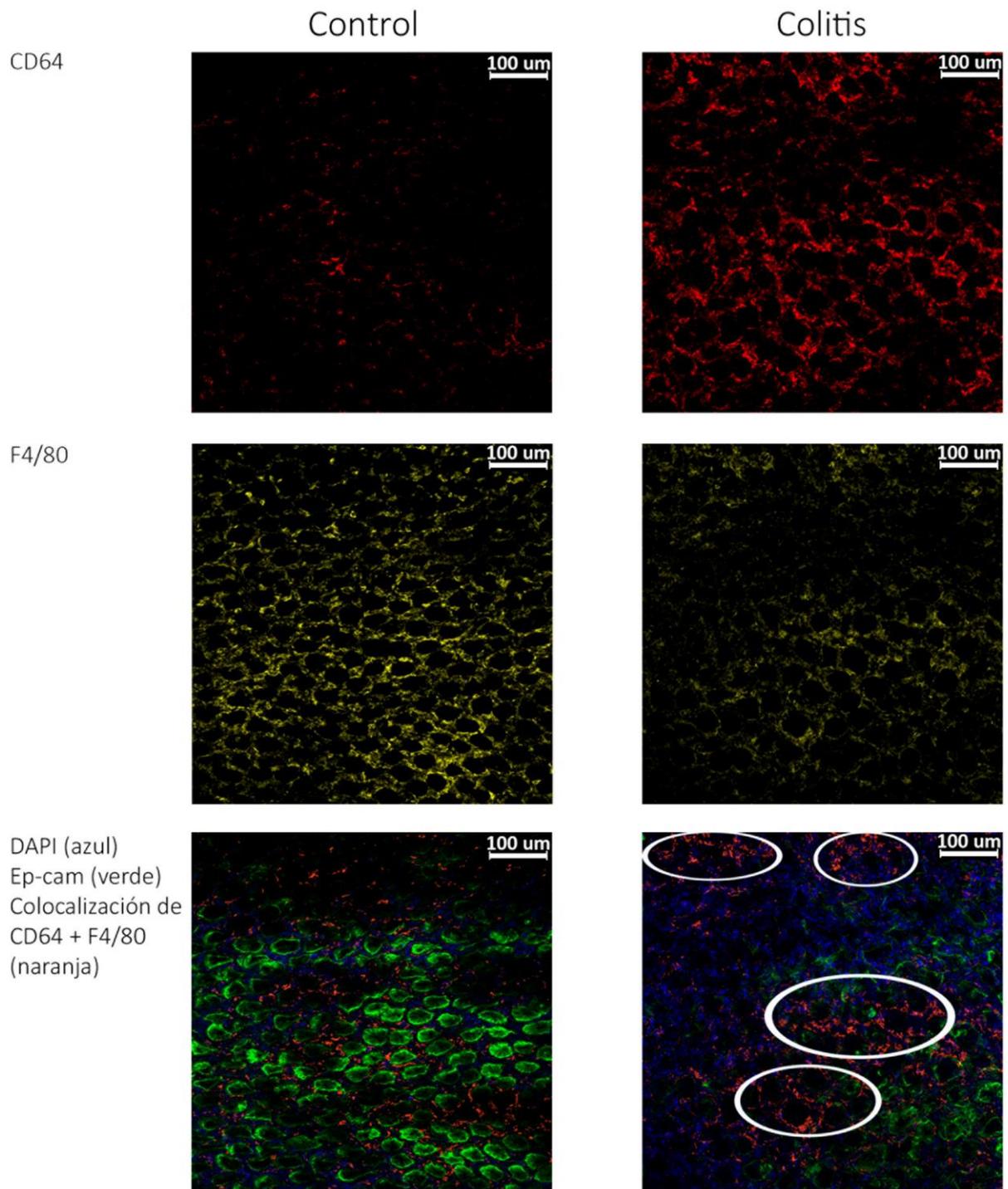


Figura 9. Localización de macrófagos CD64+F4/80+ en la LP de colon en condiciones inflamatorias. Inmunofluorescencia de tejido entero en muestras de colon de animales control (izquierda) o DSS (derecha). Marcadores DAPI (azul), Ep-Cam (verde), CD64 (rojo) y F4/80 (amarillo). En las figuras inferiores se muestra la colocalización de CD64 y F4/80 (naranja). Las elipses blancas indican las zonas de focos inflamatorios en muestras de animales colitis, a diferencia del patrón homogéneo en muestras de animales control. Cada imagen (Z stack) integra 4 planos focales distintos, desde más superficial a más profundo. Fotografías con aumento 20x representativas de 2 experimentos con n=3/grupo. Las imágenes se obtuvieron en un Microscopio Confocal Olympus FV1200.

característica del colon, incremento en el infiltrado leucocitario tanto en mucosa como en submucosa y un importante edema en los animales DSS (Pedrotti y col., 2017). En estos sitios se produciría una mayor interacción de las poblaciones de LP con los Ags del lumen, por lo que tendrían una naturaleza presumiblemente inflamatoria, ya que los sitios lesionados en el colon están asociados con una comunidad microbiana alterada, mayor permeabilidad y una mayor invasión (Libertucci y col., 2018).

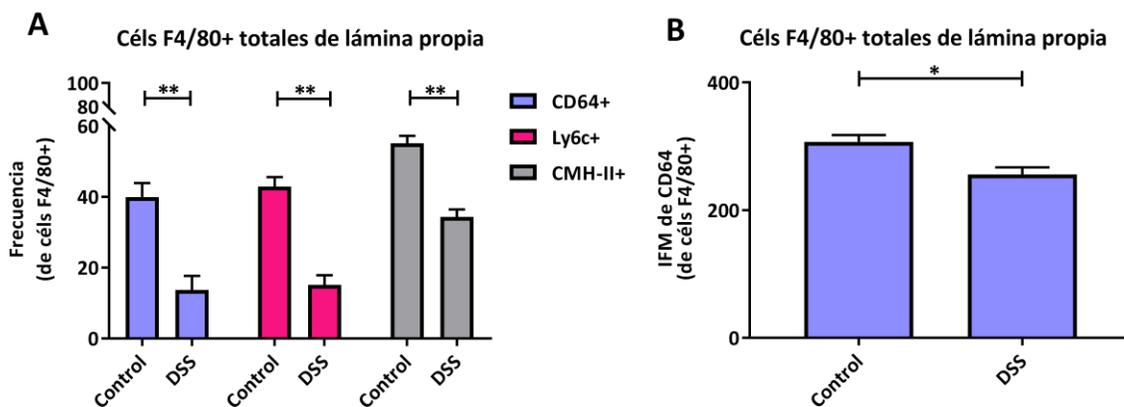


Figura 10. Evaluación de marcadores CD64, Ly6c y CMH-II en LP de colon de ratones control o DSS. En el día 7 del protocolo de colitis se prepararon suspensiones celulares y se seleccionaron células F4/80+ con la estrategia de “gate” descrita en la Fig. 2A a partir de 10^5 células adquiridas en el citómetro. **A)** Frecuencia de células F4/80+ que expresan CD64, Ly6c o CMH-II en ratones control o DSS. **B)** Intensidad de expresión de CD64 en células F4/80+ de ratones control o DSS. Los datos son medias \pm SEM (n=5) de 2 experimentos similares; * p<0,05; ** p<0,01.

Considerando que en el modelo de colitis inducida por DSS (ratones DSS) los MØs están más expuestos a estímulos luminales, se evaluaron los marcadores en estudio en suspensiones de células de LP de ratones en condiciones inflamatorias en el día 7 del protocolo, por citometría de flujo. En ratones DSS la frecuencia de células F4/80+ que expresan CD64, Ly6c y CMH-II disminuyó (**Fig. 10A**), como así también la intensidad de expresión de la molécula CD64, respecto de los ratones control (**Fig. 10B**).

Para confirmar si la modulación negativa de estos marcadores es consecuencia del microambiente inflamatorio, células mononucleares de MO de

ratones CD45.1 marcadas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) se transfirieron a ratones CD45.2 controles ó en el día 5 del protocolo de DSS. Esta marcación con CFSE se realizó a los fines de amplificar la detección de las células CD45.1 transferidas. Por otra parte, se seleccionó el día 5 ya que corresponde al día de mayor severidad en el proceso inflamatorio (Pedrotti y col., 2016). A las 48 hs (coincidentes con el día final del protocolo) se aislaron distintos tejidos linfoides y se prepararon suspensiones celulares para analizar la frecuencia de células CD45.1+ CFSE+ en cada condición. En huéspedes controles se recuperó un porcentaje significativamente mayor de células transferidas de la LP comparado con otros tejidos linfoides. Como se observa en la **Fig. 11**, este marcado tropismo se perdió con el proceso inflamatorio.

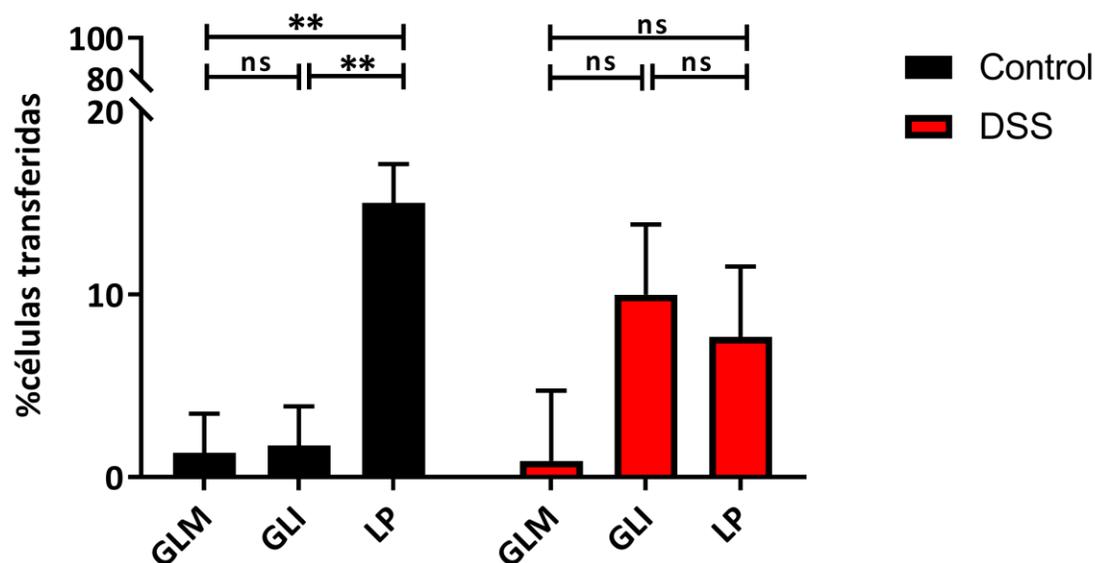


Figura 11. Proporción de células recuperadas de diferentes tejidos linfoides en condiciones homeostáticas e inflamatorias después de la transferencia. Ratones CD45.2 control o DSS fueron transferidos con células totales de MO de animales CD45.1 marcadas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en el día 5 del protocolo de colitis y 48 hs más tarde se obtuvieron suspensiones celulares de GLM, GLI y LP. A partir de 10^5 células adquiridas en el citómetro se utilizó la estrategia de “gate” descrita en la Fig. 2A y se seleccionaron células CD45.1+ CFSE+. Los resultados se expresaron como porcentaje de células transferidas. Los datos son medias \pm SEM de (n=5) de 2 experimentos similares; ** p<0,01.

El análisis de las células CD45.1+ F4/80+ recientemente arribadas a la LP evidenció nuevamente la disminución de la frecuencia de los marcadores CD64, Ly6c y CMH-II en condiciones inflamatorias respecto de la condición control (**Fig. 12A**), demostrando que la modulación de dichos marcadores está fuertemente influenciada por el microambiente intestinal, y que no es una característica exclusiva de las células residentes en la LP. La expresión de CD64 fue similar en las dos condiciones analizadas (**Fig. 12B**).

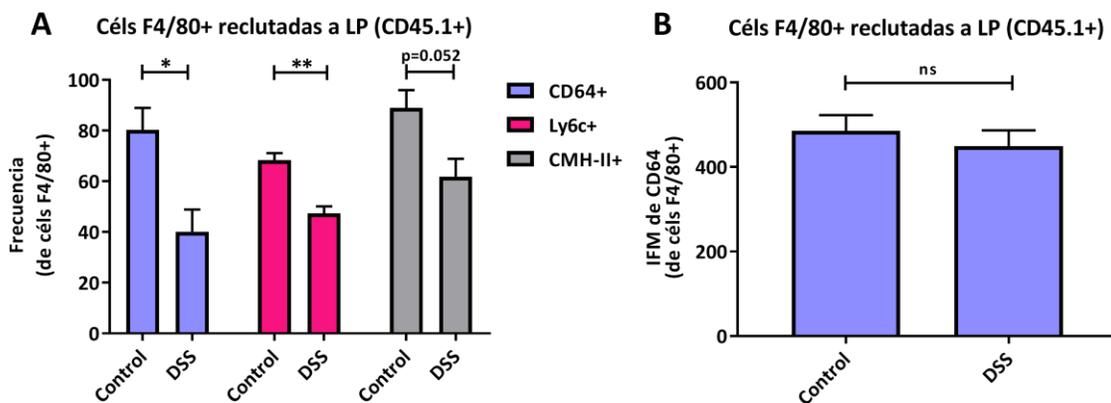


Figura 12. Evaluación de marcadores fenotípicos en células recuperadas de LP de colon en condiciones homeostáticas e inflamatorias luego de la transferencia. Ratones CD45.2 control o DSS fueron transferidos con células totales de MO de animales CD45.1 marcadas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en el día 5 del protocolo de colitis y 48 hs más tarde se obtuvieron suspensiones celulares de LP y en células CD45.1+ CFSE+ F4/80+ se determinó **A**) Frecuencia de expresión de CD64, Ly6c o CMH-II y **B**) Intensidad de expresión de CD64 en ratones control o DSS. Los datos son medias \pm SEM (n=5) de 2 experimentos similares; ** p<0,01.

La siguiente pregunta fue si la disminución de la proporción de células CD64+ en condiciones inflamatorias en comparación con el estado basal podría deberse a la internalización de esta molécula. Para dilucidarlo, se evaluó la frecuencia de células con CD64 en la superficie y CD64 intracitoplasmático (luego de la permeabilización con CytoFix/CytoPerm) utilizando citometría de flujo (**Fig. 13A**). Tanto en la condición homeostática como en la inflamatoria, la distribución de la molécula CD64 fue prevalentemente intracelular (**Fig. 13B, C y D**).

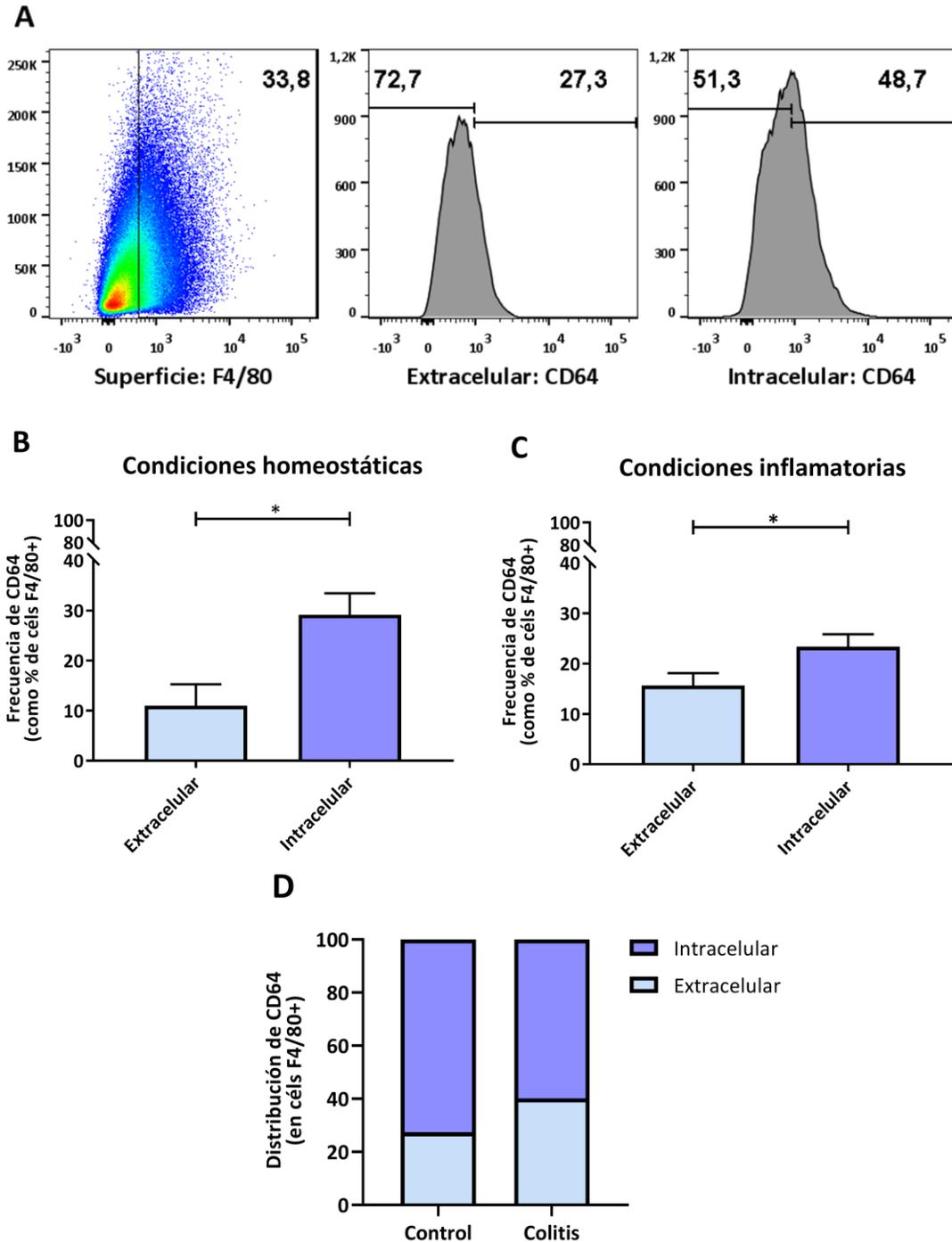


Figura 13. Evaluación de la expresión intracelular y extracelular de CD64 en células de la LP de colon de ratones control y DSS. Las células se trataron con Ac anti CD64 PerCP-Cy5.5, se incubaron con exceso de Ac anti CD64 sin marca, se permeabilizaron y se incubaron con un segundo Ac anti CD64-PE. **A)** Estrategia de análisis en una muestra representativa con selección de la población de células F4/80+ y evaluación de CD64 extracelular e intracelular a partir de 10^5 células adquiridas en citómetro. **B)** Frecuencia de células F4/80+ expresando CD64 extracelular e intracelular en condiciones homeostáticas (ratones control) o **C)** inflamatorias (ratones DSS). **D)** Distribución de CD64 en ambas condiciones. Los datos son medias \pm SEM de 3 experimentos con $n=3$ /grupo. * $p<0,05$.

Para corroborar esta distribución diferente de CD64, se estudió la presencia de IgG intracelular, el ligando de CD64. Para ello, suspensiones de células de LP de ratones control o DSS obtenidas el día 7 (día final) del protocolo de colitis se marcaron con F4/80, se permeabilizaron (CytoFix/CytoPerm) y se incubaron con anti IgG-conjugada a isotiocianato de fluoresceína (IgG-FITC). La **Fig. 14A** muestra un experimento representativo, en el que se observó una disminución de aproximadamente 8% en la frecuencia de células F4/80+IgG+ en la condición inflamatoria. La observación de estas células al microscopio mostró patrones de fluorescencia cualitativamente diferentes: en células de animales control se observaron acúmulos de fluorescencia verde con un patrón moteado (flechas blancas), mientras que en células provenientes de animales DSS la tinción fue más homogénea, con gránulos más finos (**Fig. 14B**).

Considerando que los distintos patrones observados al analizar la IgG intracelular podrían deberse a diferencias en la internalización/degradación, se realizó un experimento incluyendo el inhibidor de tráfico vesicular Bafilomicina A, para bloquear el reciclado de IgG asociada a su receptor en las células de LP. Como se observa en la **Fig. 14C**, en presencia del inhibidor, la expresión de IgG en células CD11b+F4/80+ en la condición inflamatoria recuperó los valores de la condición homeostática, sugiriendo que en células de ratones con colitis habría una degradación más veloz de la molécula IgG.

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran que el fenotipo de los MØs F4/80+ CD64+ de la LP es particular en este microambiente comparado con otros órganos linfoides y puede variar según las señales del tejido. Las células con dicho fenotipo presentaron además mayor proporción de CD64 intracelular tanto en la condición control como en la inflamatoria. Se evaluó entonces la funcionalidad de esta molécula a través de la captación (uptake) de complejos inmunes (CIs) via Fcγ utilizando diferentes condiciones experimentales.

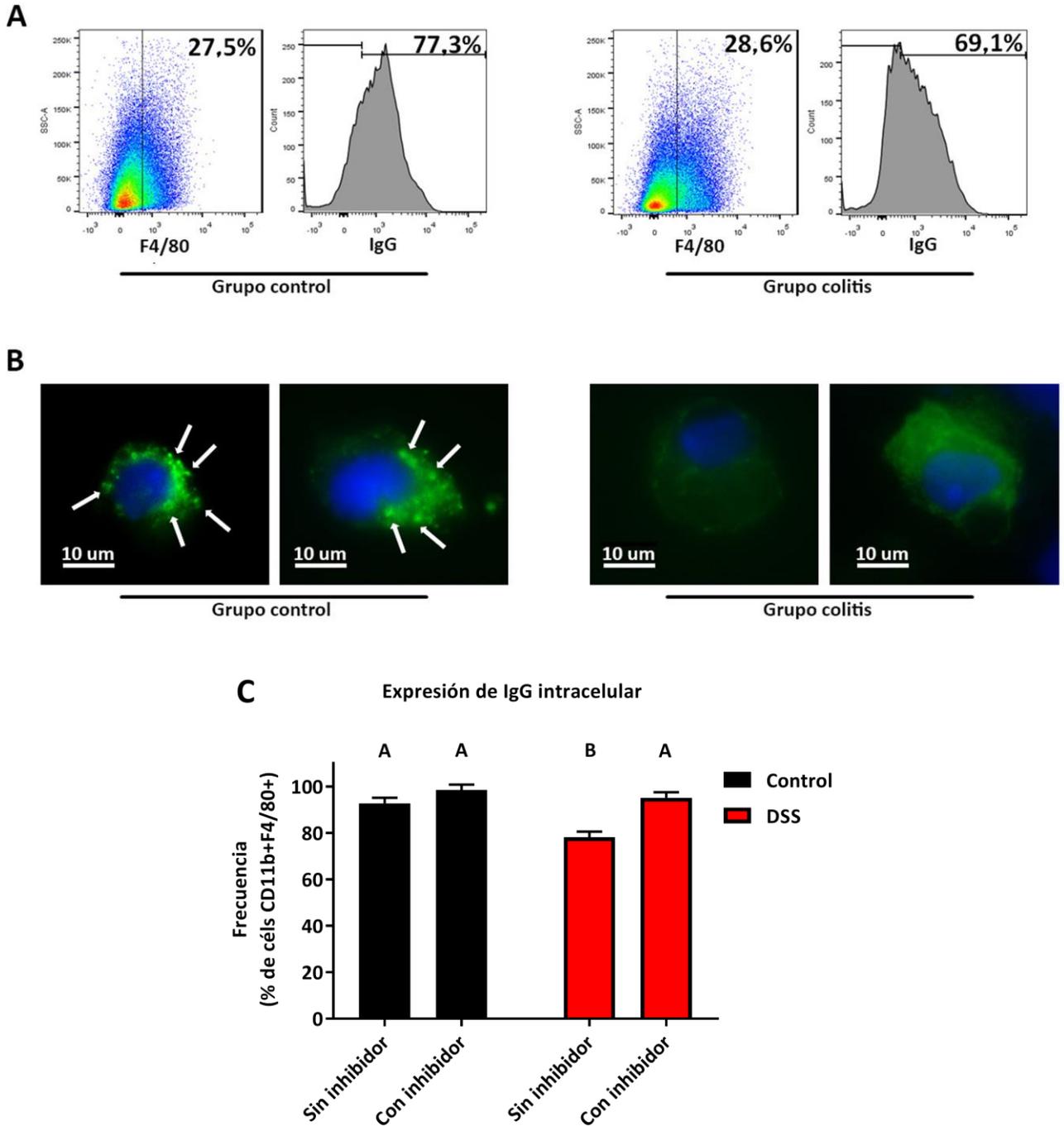


Figura 14. Evaluación de IgG intracelular en células F4/80+ de LP de ratones control y colitis. Las células se trataron con Ac anti F4/80, se permeabilizaron y se incubaron con un Ac anti IgG conjugado a FITC. **A)** Estrategia de análisis en una muestra representativa con selección de la población de células F4/80+ y evaluación de IgG intracelular a partir de 10^5 células adquiridas en citómetro. **B)** Las células permeabilizadas y marcadas con el Ac anti-IgG se utilizaron para hacer citoextendidos; éstos fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Leica DMI 8. Imágenes representativas de IgG intracelular en células con morfología de MØ de LP de animales control o con colitis; las flechas muestran acúmulos de fluorescencia verde con un patrón moteado. **C)** Frecuencia de células F4/80+ que expresan IgG intracelular en ratones control o DSS, con o sin el agregado de Bafilomicina A (inhibidor). Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con $n=3$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p<0,05$.

En una primera etapa, se prepararon CIs de la proteína Ovoalbúmina (OVA) marcada con FITC y suero policlonal de conejo específico contra OVA obtenido por inmunizaciones múltiples a los efectos de contar con CIs detectables por citometría de flujo (CIs OVA-FITC). Para determinar la concentración de CI y el tiempo adecuados para los experimentos, se utilizaron CIs con la siguiente composición:

- 1/75: suero de conejo diluído 1/75 y OVA-FITC 1,6 µg/mL
- 1/15: suero de conejo diluído 1/15 y OVA-FITC 8 µg/mL
- 1/7,5: suero de conejo diluído 1/7,5 y OVA-FITC 16 µg/mL

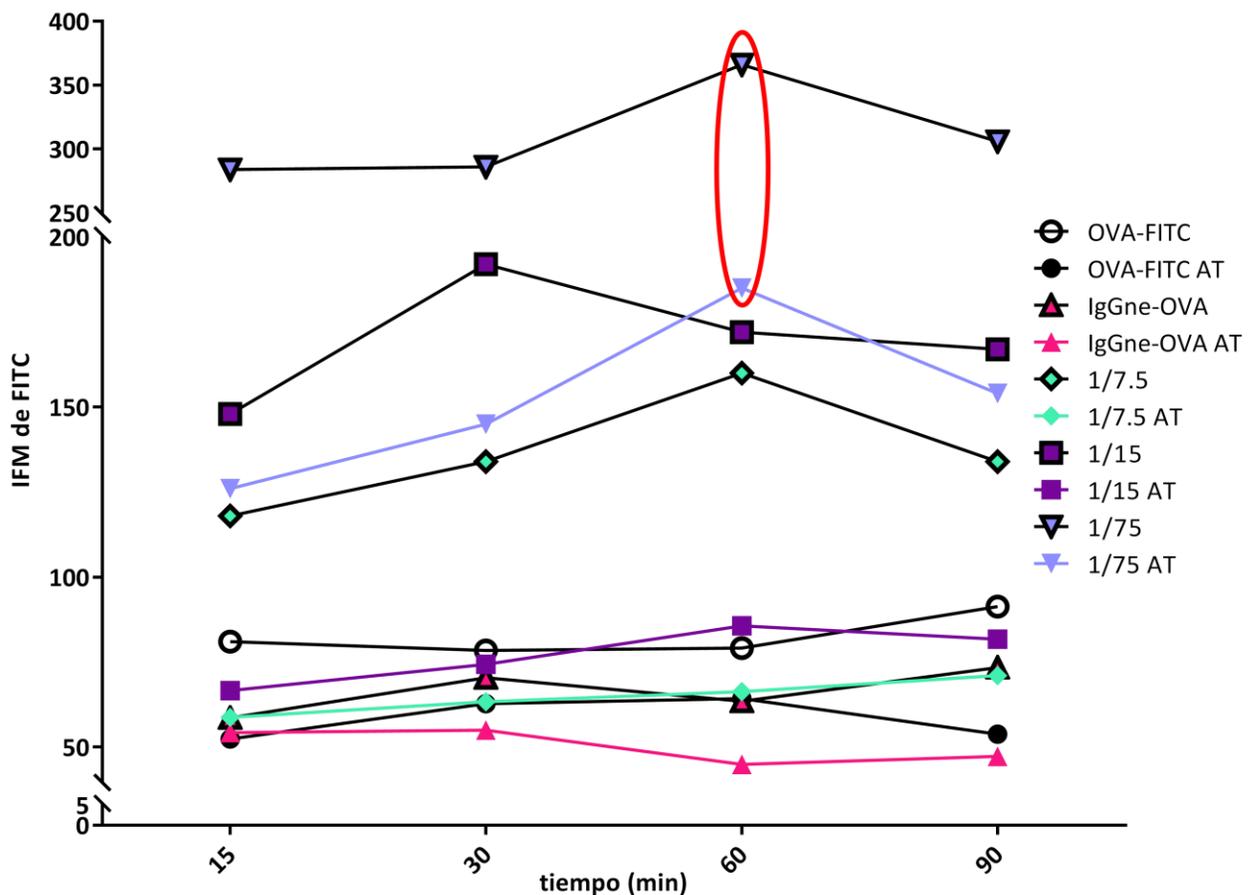


Figura 15. Estandarización de la captación de CIs de proteínas solubles por MØs diferenciados de MO. Los MØs fueron incubados por 15, 30, 60 o 90 min en presencia de OVA-FITC, IgGne y OVA-FITC, o diferentes concentraciones de CIs OVA-FITC: IgG (/75, 1/15 y 1/7,5) por duplicado: con o sin Azul de Tripán (AT).

Además, se consideraron 4 tiempos de incubación (15, 30 60 y 90 min). Como controles se utilizaron OVA-FITC, una IgG no específica contra OVA (IgGne) y OVA-FITC sin inmunoglobulinas. Se emplearon MØs de MO según el protocolo descrito en la **Fig. 4B**. Cada muestra se procesó por duplicado y se adicionó azul de tripán (AT) a una de ellas, un colorante que extingue la fluorescencia extracelular, de manera que la fluorescencia de FITC detectada por el citómetro, es sólo intracelular y corresponde a las moléculas de CIs OVA-FITC que efectivamente han sido internalizadas por las células (Santos y col., 2015). En la **Fig. 15** se representó la intensidad de fluorescencia de las células incubadas con los distintos estímulos a los 4 tiempos de estudio. Como se observa, las células con el agregado de OVA-FITC u OVA-FITC + IgGne mostraron los menores valores de fluorescencia de todo el ensayo y sólo fueron levemente atenuados con AT. Por otra parte, a los 60 min y con la concentración de 1/75 se observó la mayor IFM, aún luego de la extinción con AT; en base a los resultados, se seleccionaron estas condiciones para los experimentos subsiguientes (60 min como tiempo de incubación y concentración de CIs 1/75). Siguiendo estas condiciones experimentales, MØs de LP purificados por citometría de flujo, usando el marcador fenotípico F4/80 para evitar la estimulación de la vía Fcγ durante la inmunomarcación, se incubaron con OVA-FITC + IgGne o CIs OVA-FITC, en ausencia o presencia de AT. La **Fig. 16A** muestra un ensayo representativo, donde la frecuencia de células fluorescentes luego de la incubación con OVA-FITC+ IgGne sufrió una significativa disminución con el agregado de AT (86,6%) mientras que la reducción fue sólo de un 5,6% en presencia de CIs. De esta forma, un 28,2 % de MØs F4/80+ internalizó específicamente los CIs (**Fig. 16A, MØs LP + CIs+ AT**). El experimento se repitió agregando un anticuerpo bloqueante de otros receptores de Fcγ (anti-CD16/CD32) y en este caso se observó un 55% de atenuación en las células incubadas con OVA-FITC + IgGne, y un 30% en aquellas incubadas con CIs OVA-FITC (**Fig. 16B**). En este

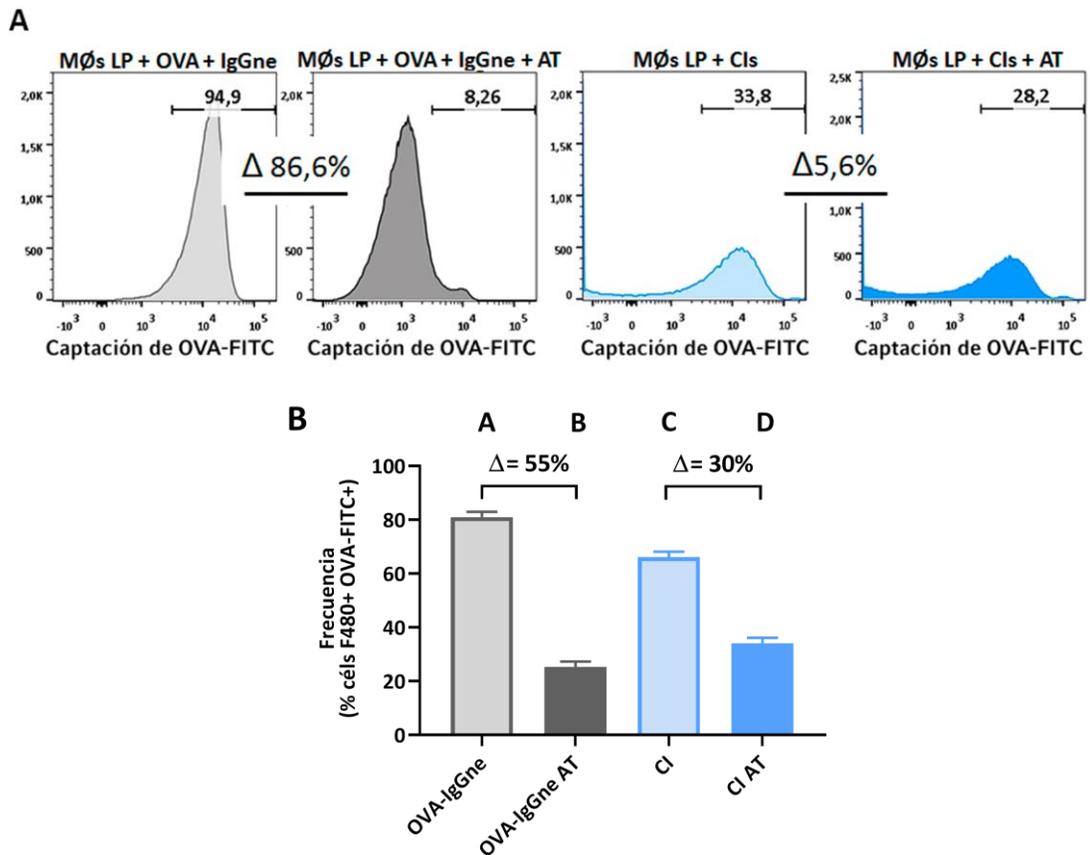


Figura 16. Captación de Cls de proteínas solubles por MØs de LP purificados por cell sorting. Los MØs F4/80+ fueron incubados por 60 min en presencia de OVA-FITC, IgGne y OVA-FITC, o Cls OVA-FITC: IgG (1/75) con o sin Azul de Tripán (AT). **A)** Histogramas representativos en los que se indica la variación del porcentaje de células FITC+ por el AT. **B)** Frecuencia de células F4/80+ (tratadas con anti-CD16/CD32) que incorporaron OVA-FITC. Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con $n=3$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p<0,05$.

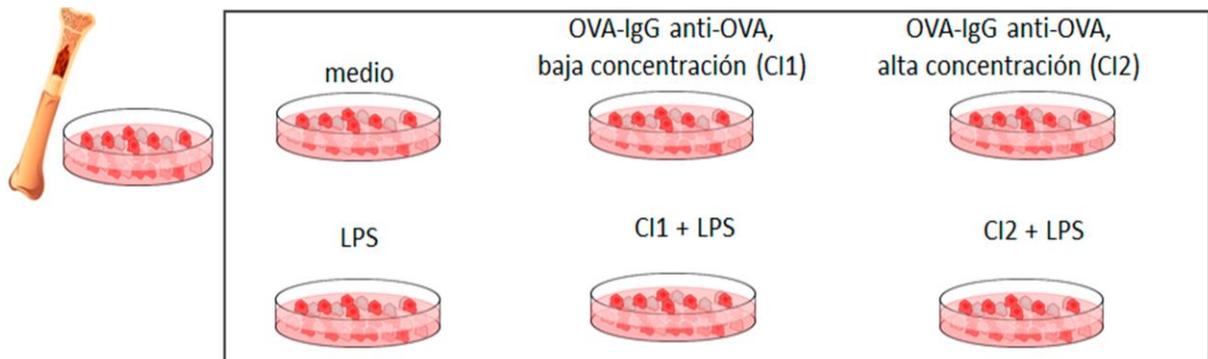


Figura 17. Esquema experimental de ensayos *in vitro* utilizando MØs de MO. Dichos MØs fueron estimulados con Cls de proteínas solubles en concentración baja (CI1: 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA; 1/75 suero anti-OVA) o alta (CI2: 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA; 1/7,5 suero anti-OVA), LPS (1 mg/mL) y una mezcla de ambas concentraciones de Cls y LPS.

caso, y considerando que los otros receptores de Fc γ estuvieron bloqueados, la proporción de células que incorporó CIs a través del Fc γ RI fue del 30% demostrando que el CD64 de M ϕ s de LP es funcional e incorporaría CIs de manera específica, lo que no ocurre cuando la IgG no se encuentra unida a su Ag específico.

Teniendo en cuenta que la obtención de M ϕ s de LP por citometría de flujo es una técnica laboriosa, con bajo rendimiento y poca viabilidad que produce una alta variabilidad en los resultados, principalmente debido al estrés que experimentan las células, se realizaron una serie de experimentos utilizando el modelo de M ϕ s de MO (**Fig. 4B**). Estos ensayos además fueron relevantes porque se desconoce si los M ϕ s obtenidos *in vitro* son un buen modelo para estudiar la activación de M ϕ s del tracto gastrointestinal por CIs de tipo IgG (Castro-Dopico y Clatworthy, 2019). Los M ϕ s extraídos de MO se estimularon por 24 ó 48 hs con:

- Medio fresco
- CI1: suero de conejo diluído 1/75 y OVA-FITC 1,6 μ g/mL
- CI2: suero de conejo diluído 1/15 y OVA-FITC 8 μ g/mL
- Lipopolisacárido (LPS), un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) muy abundante en el lumen, 1 mg/mL
- Mezcla de CI1 y LPS
- Mezcla de CI2 y LPS

y luego de la incubación se evaluó el fenotipo de los M ϕ s por citometría de flujo (**Fig. 17**). Los marcadores CD11b y CD64 incrementaron su expresión en M ϕ s F4/80+ estimulados con LPS con respecto a la condición control con medio de cultivo fresco (**Fig. 18A y B**). Sin embargo, cuando los M ϕ s fueron estimulados con CIs en ambas concentraciones, se produjo una disminución de la IFM, incluso cuando fueron agregados concomitantemente con LPS (**Fig. 18A y B**).

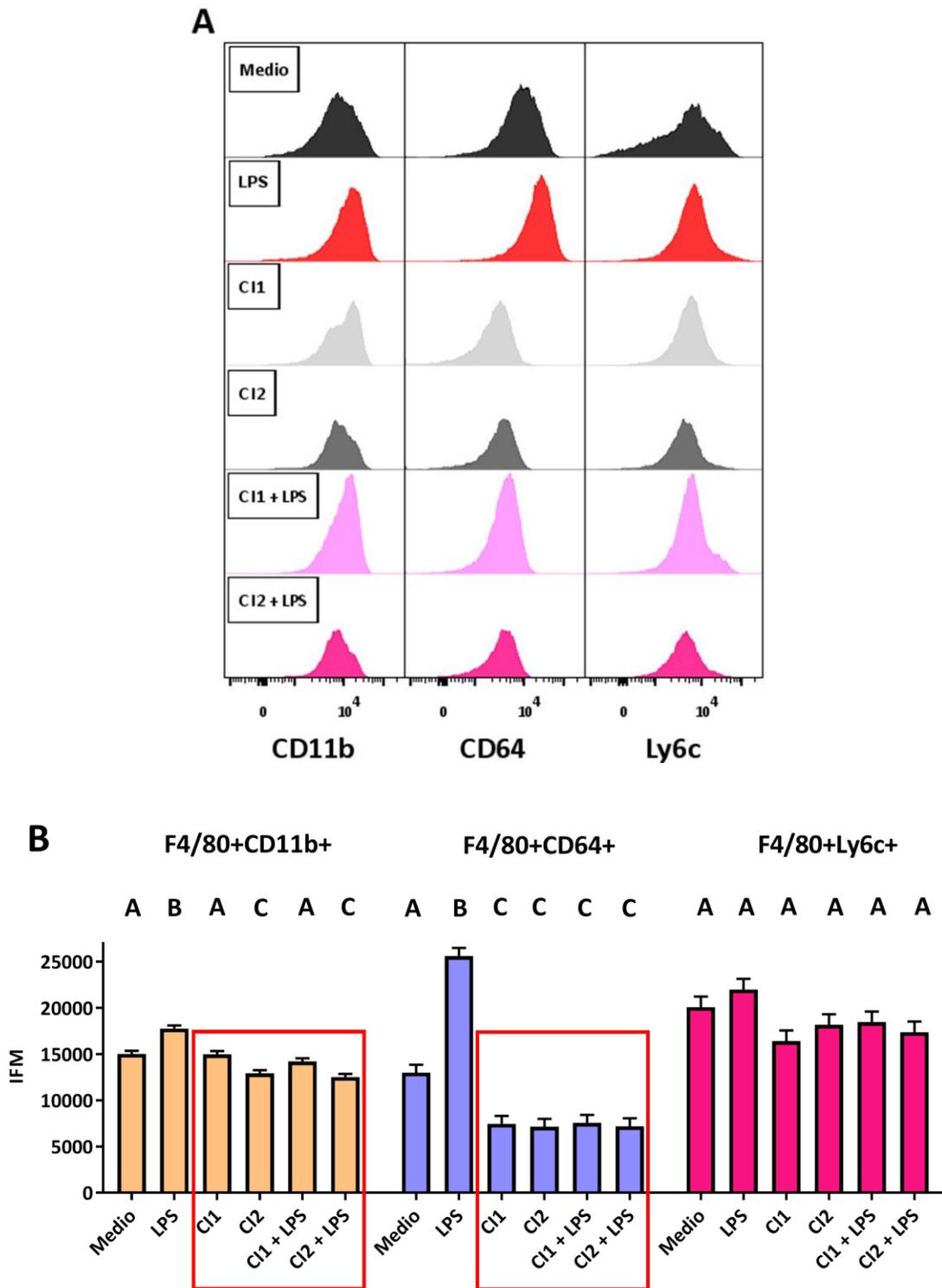


Figura 18. Marcadores fenotípicos expresados por MØs de MO luego de la estimulación con CIs de proteínas solubles. Los MØs de MO fueron incubados con medio, LPS, CIs o LPS+CIs. Luego de 24 hs las células se marcaron para el análisis por citometría de flujo. **A)** Histogramas representativos de cada marcador fenotípico en las distintas condiciones experimentales en 10^5 células adquiridas en el citómetro. **B)** Intensidad de expresión de los marcadores en las mismas condiciones experimentales. Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con $n=3-4$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p < 0,05$.

Para los experimentos siguientes, sólo se trabajó con la concentración baja CI1 (a partir de ahora referida simplemente como CIs), ya que los efectos observados fueron los mismos a ambas concentraciones. En un cultivo de MØs de MO estimulados con medio fresco, LPS, CIs y mezcla de LPS + CIs se evaluaron mediadores solubles mediante reacciones colorimétricas para establecer la funcionalidad y el tipo de activación que se potencia. El agregado de LPS indujo un aumento tanto en la producción de nitritos como en la de IL-6 e IL-10 respecto a la condición control ($p < 0,05$), lo que no se observó con el agregado de CIs. En la condición LPS + CIs sin embargo, se redujo un 50% la concentración de nitritos ($p < 0,05$) y aumentó la producción de citoquinas que podrían tener actividades compensatorias en la inflamación ($p < 0,05$) (Fig. 19).

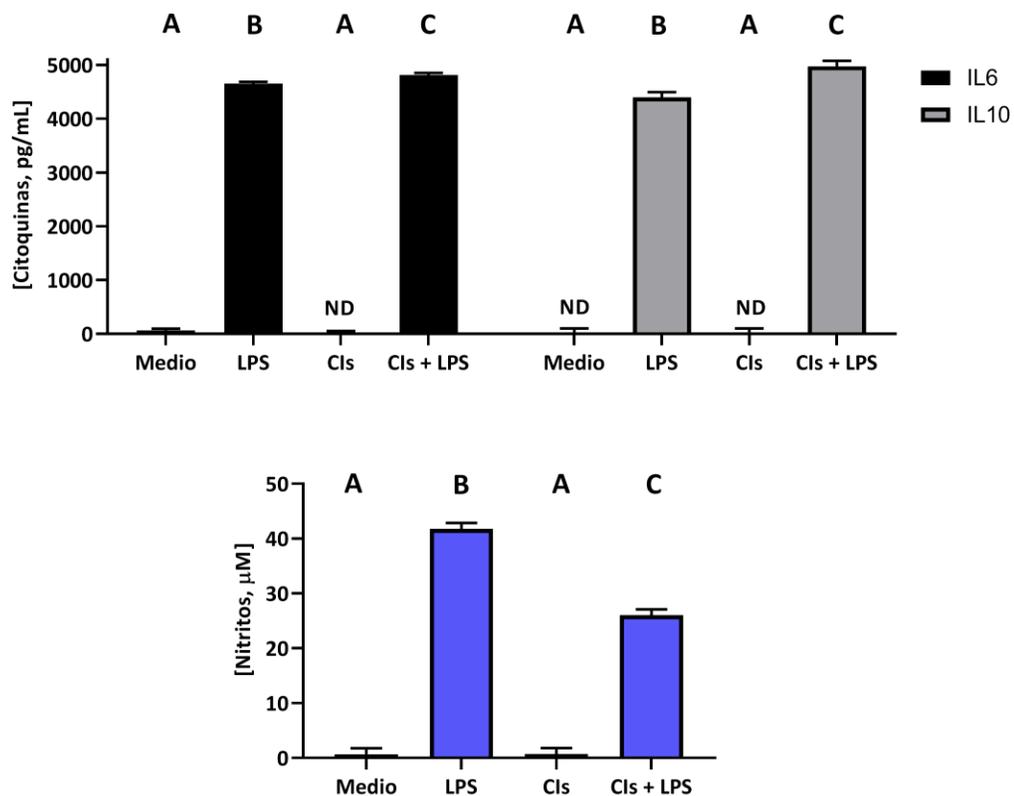


Figura 19. Mediadores solubles (IL6, IL10 y nitritos) producidos por MØs de MO luego de la estimulación con CIs de proteínas solubles. Los MØs de MO fueron incubados con medio, LPS, CIs (1/75) o LPS+CIs. Luego de 48 hs se recogió el sobrenadante para la determinación de citoquinas (ELISA) y nitritos (método colorimétrico). Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con $n=3$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p < 0,05$.

Para establecer un modelo que reproduzca mejor las condiciones de la LP, se prepararon cultivos de explanto de colon de animales control o con protocolo DSS y el sobrenadante se empleó como medio de cultivo condicionado, con el objetivo de mimetizar el ambiente en el que se encuentran los MØs intestinales (**Fig. 20**). Las condiciones experimentales incluyeron dos grupos: con y sin agregado de LPS, y en todos los casos se evaluó la expresión de CD11b, CD64 y Ly6c en MØs F4/80+ por citometría de flujo.

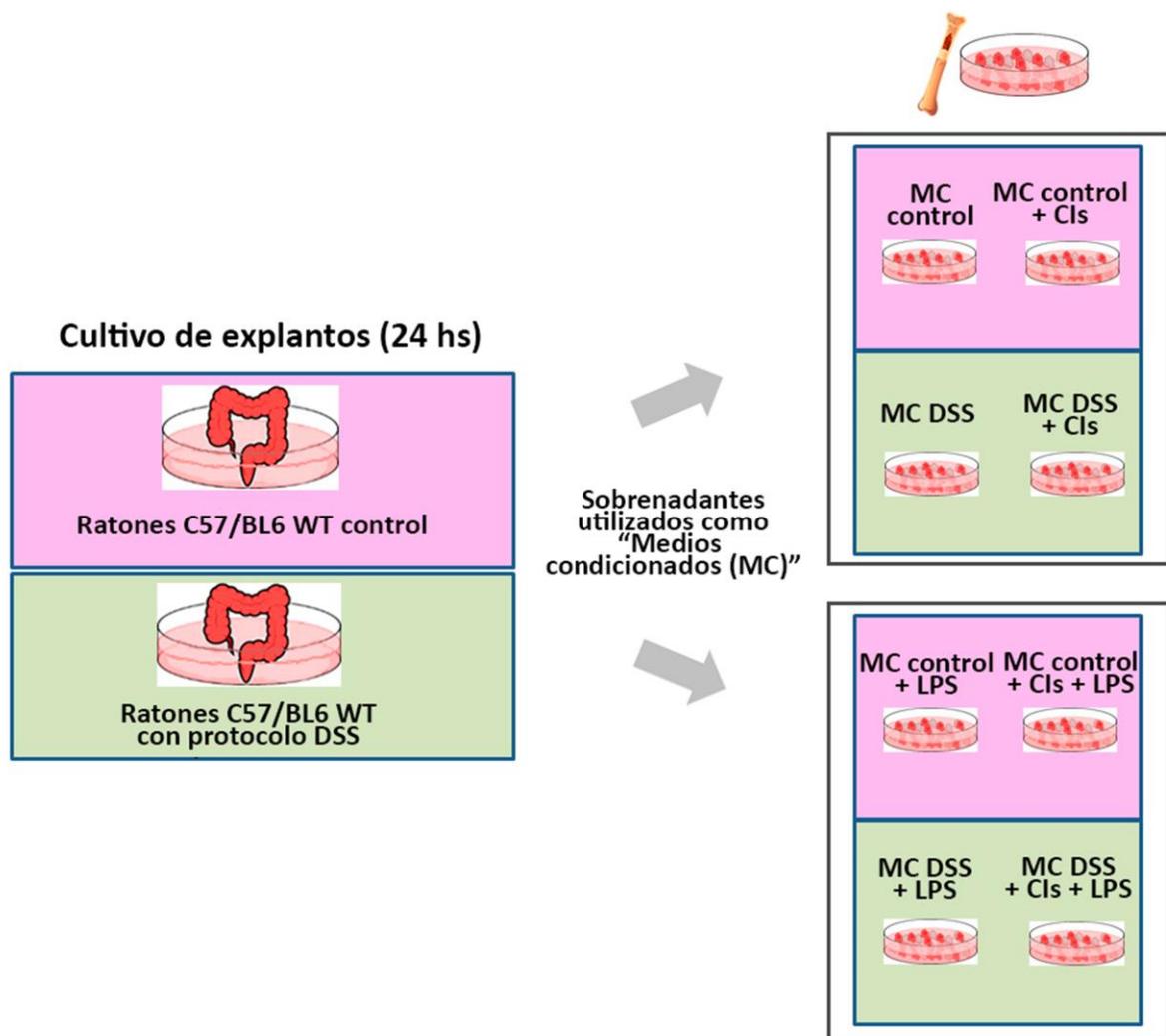


Figura 20. Esquema experimental de ensayos *in vitro* de MØs de MO estimulados con CIs de proteínas solubles utilizando medios condicionados de cultivos de explanto de colon proveniente de animales control o animales con colitis al día 7.

Las **Figuras 21A y 22A** muestran histogramas representativos de los marcadores evaluados, con el fin de representar gráficamente los cambios en la expresión en las diferentes condiciones experimentales; la integrina CD11b no presentó modificaciones, por lo que no fue incluida en los gráficos de barra que representan la frecuencia de células con el marcador indicado, normalizada, en todos los casos, a la condición “MC control” (panel B); la intensidad de fluorescencia media de cada marcador también normalizada en todos los casos, con el valor del “MC control” (panel C).

En el grupo sin agregado de LPS, la frecuencia de F4/80 no se vió modificada según el estímulo; el marcador CD64 disminuyó en frecuencia e intensidad cuando se adicionaron CIs a diferencia de lo observado con células tratadas sólo con medio condicionado control o medio condicionado DSS (**Fig. 21**). Para Ly6c se observó disminución de la intensidad de expresión en células incubadas en medio condicionado control o DSS cuando estuvieron presentes los CIs a diferencia de lo observado con los medios condicionados solamente.

Cuando el ensayo se realizó con agregado de LPS, solamente en el caso del medio condicionado DSS y CIs se observó una disminución de la frecuencia e intensidad de expresión de CD64 y Ly6c (**Fig. 22**). Esto podría indicar que los CIs aún en situaciones sumamente inflamatorias, representadas por el medio condicionado DSS con el agregado de LPS, pueden atenuar la expresión de marcadores inflamatorios de los MØs como Ly6c. De manera similar a nuestros resultados, después de un estímulo de activación breve (<60 min) con ésteres de forbol se observó la disminución en expresión de la molécula Ly6c en monocitos (Jutila y col., 1994). La molécula Ly6c se usa principalmente como marcador para caracterizar subpoblaciones y la relevancia de los cambios en su expresión no se comprende totalmente, ya que se desconoce su ligando natural. Se encuentra en monocitos, situada en la superficie celular unida a la membrana por un ancla de un glicolípido,

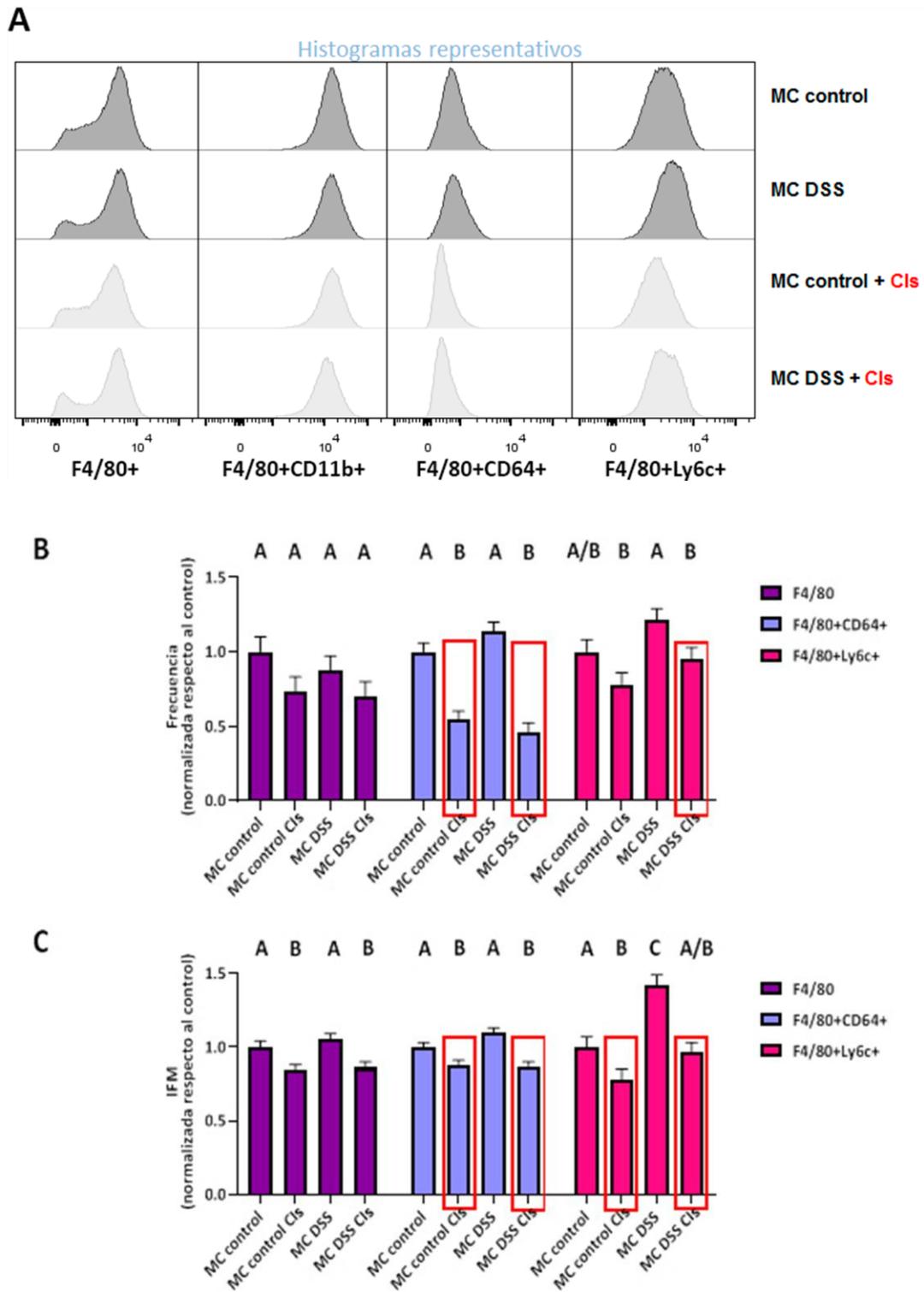


Figura 21. Marcadores fenotípicos en MØs de MO estimulados con Cls de proteínas solubles utilizando medios condicionados de cultivos de explanto de colon. Los MØs de MO fueron incubados en medios condicionados de ratones control o DSS y estimulados con medio y Cls (1/75). **A)** Histogramas representativos en las distintas condiciones experimentales en 10^5 células adquiridas en el citómetro. **B)** Frecuencia y **C)** Intensidad de expresión de los distintos marcadores fenotípicos. Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con $n=3-4$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p<0,05$

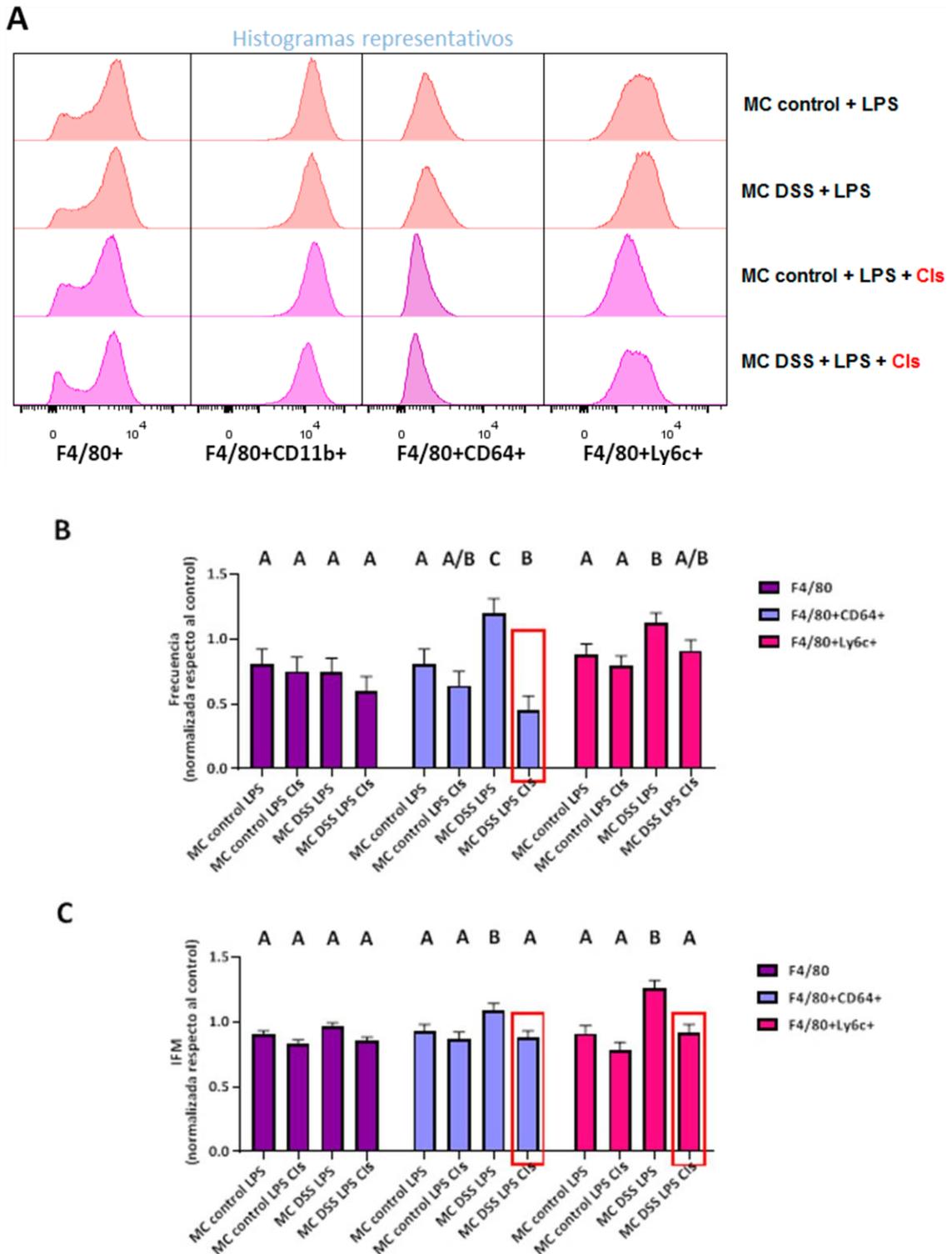


Figura 22. Marcadores fenotípicos producidos por MØs de MO estimulados con Cls de proteínas solubles utilizando medios condicionados de cultivos de explanto y agregado de LPS. Los MØs de MO fueron incubados en medios condicionados de ratones control o DSS y estimulados con LPS y Cls (1/75). **A)** Histogramas representativos en las distintas condiciones experimentales en 10^5 células adquiridas en el citómetro. **B)** Frecuencia y **C)** Intensidad de expresión de los distintos marcadores fenotípicos. Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con $n=3-4$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p<0,05$.

glicosilfosfatidilinositol (GPI) y carece de cola intracitoplasmática por lo que no señala directamente (Lee y col., 2013). Se cree que puede interactuar con proteínas de transmembrana para iniciar cascadas de señalización, por lo que en estos experimentos, podría estar asociada a los cambios en la membrana iniciados por la estimulación a través del FcγRI.

Como conclusiones parciales de los experimentos descritos en el Capítulo I, se pueden destacar las siguientes observaciones:

- De los marcadores estudiados, F4/80 fue el más estable ya que la frecuencia de expresión y la intensidad de fluorescencia media se conservaron en condiciones control o DSS, mientras que ambos parámetros para Ly6c y CD64 fueron modulados por el ambiente inflamatorio.
- La localización de las células CD64+F4/80+ o CD64+CD11b+ en muestras de colon mostró patrones homogéneos en condiciones homeostáticas, mientras que en el curso de una respuesta inflamatoria, éstas se redistribuyeron en focos en los que el tejido colónico se vió desorganizado por la injuria.
- En MØs de LP, la frecuencia de CD64 intracelular fue mayor que la extracelular; el ligando de este receptor (IgG) se visualizó en el citosol de células control en acúmulos citoplasmáticos en tanto que en células de animales tratados con DSS se observó un puntillado fino de manera más difusa, posiblemente debido a diferencias en la degradación de dichas moléculas en las condiciones evaluadas.
- Experimentos *in vitro* con MØs de MO mostraron que los Cls tienen un potente efecto atenuador-modulador de la expresión de CD64 y de Ly6c pero no del marcador F4/80.
- En ensayos *in vitro* el agregado de LPS a MØs de MO produjo un aumento en la producción de nitritos, IL-6 e IL-10, respecto de la condición control y

luego del agregado de CIs. Sin embargo, el estímulo de LPS + CIs redujo a la mitad la producción de nitritos, y aumentó significativamente la producción de citoquinas.

- El uso de medios condicionados para mimetizar el ambiente intestinal, si bien no reproduce completamente los efectos de todos los mediadores solubles o interacciones célula-célula o con la matriz extracelular que modulan la reactividad de los MØs aislados de LP, permitió demostrar que la disminución en la frecuencia de células que expresan el marcador CD64 ocurre exclusivamente en presencia de CIs, aún con MC DSS y la estimulación con LPS. Estos resultados son consistentes con la disminución en la frecuencia y la expresión del marcador CD64 detectada en MØs de LP de ratones DSS aislados cuando la severidad en injuria y la perturbación de la permeabilidad sugieren que habría abundancia de CIs en el tejido (Lin y col., 2019).

A raíz de los resultados obtenidos al estimular los MØs de MO y LP con CIs, la siguiente pregunta fue qué efecto podrían tener los CIs presentes en el lumen intestinal sobre los MØs CD64+ del colon. En intestino, los CIs más abundantes con los que podrían interaccionar estas células están formados prevalentemente por bacterias comensales opsonizadas con IgA y según reportes de las últimas décadas, con IgG (Yoshida y col., 2006). En un primer experimento, se realizó la detección por citometría de flujo de bacterias opsonizadas con IgA, IgG o ambas inmunoglobulinas en materia fecal (MF) de ratones controles no tratados, ratones con colitis luego del tratamiento con DSS o de la cepa μ MT. Esta última cepa fue utilizada como control, ya que no posee células B maduras, y, por lo tanto, no pueden producir el cambio de isotipo IgM a IgG o IgA (Kitamura y col., 1991); esto sirvió de estrategia para verificar que los anticuerpos hallados se unen específicamente a las inmunoglobulinas presentes en las bacterias de la MF. El patrón de opsonización de las bacterias de MF fue diferente en los 3 grupos, con una mayor proporción de bacterias doble positivas (DP) opsonizadas con IgA e IgG en la MF de ratones DSS que alcanzó un 31,22% frente a un 15,00% en los animales control (**Fig. 23A**); en animales μ MT el porcentaje fue significativamente menor aunque con una proporción mayor a la esperada (5,74%) (**Tabla 1 y Fig. 23B**), probablemente debido al pequeño número de células B1 presentes en esta cepa que producen algunos isotipos de inmunoglobulinas (Ghosh y col., 2012).

Tabla 1. Frecuencia (%) de bacterias opsonizadas con IgG e IgA en materia fecal de ratones control, con colitis y μ MT.

| Grupo | N | Medias (%) | SEM |
|----------|----|------------|------|
| μ MT | 24 | 5,74 | 3,54 |
| Control | 72 | 15,00 | 2,00 |
| Colitis | 87 | 31,22 | 1,86 |

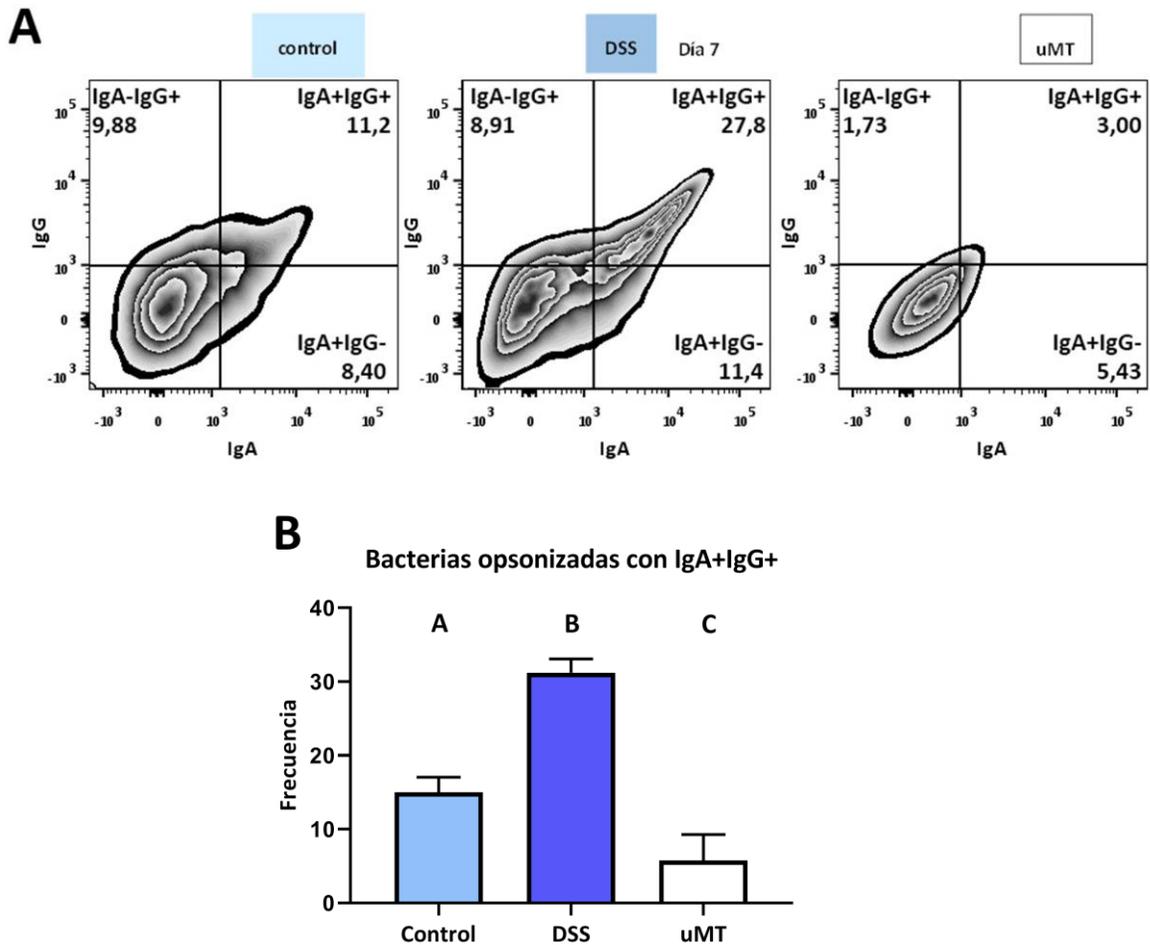


Figura 23. Bacterias opsonizadas con IgA, IgG e IgA-IgG en MF. A) Dot plots representativos de bacterias provenientes de MF de ratones control, DSS y μ MT. **B)** Gráfico de barras de la frecuencia de bacterias fecales DP en MF de ratones control, DSS y μ MT. Los datos son medias \pm SEM de n=3-4/grupo de 4 experimentos diferentes.

Se evaluó además la opsonización de bacterias aisladas directamente de la capa de mucus que recubre el colon de ratones normales, y en este caso, se observó que la frecuencia de bacterias DP alcanzó un valor promedio de $8,41 \pm 3,43$, similar al encontrado en MF del grupo control (**Fig. 24**). Estos resultados permiten concluir que los datos obtenidos con MF fueron representativos de lo que ocurre con las bacterias alojadas en el mucus del colon.

Para explicar las diferencias entre la condición control y el estado inflamatorio se plantearon dos posibilidades: que difieran las especies de bacterias aisladas de

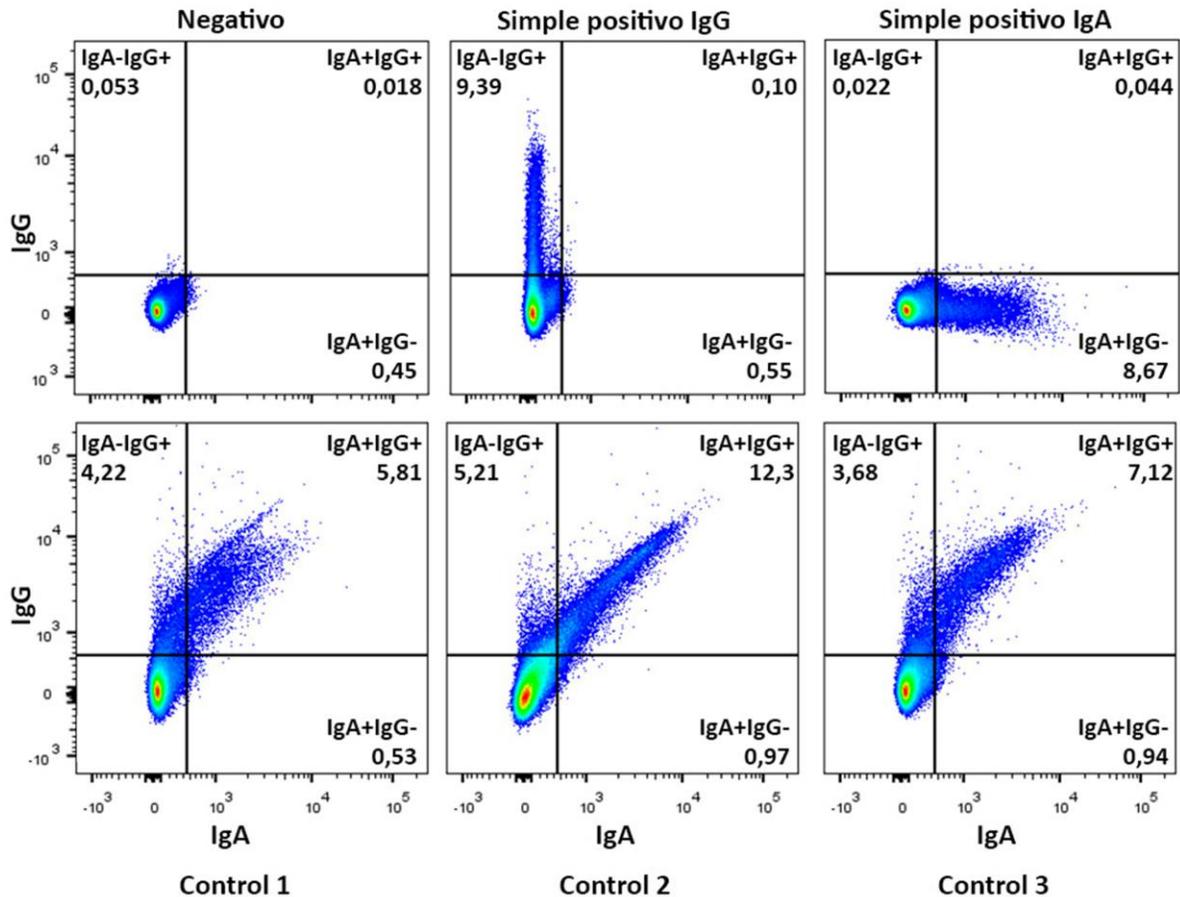


Figura 24. Frecuencia de bacterias opsonizadas con IgA, IgG e IgA-IgG alojadas en el mucus. Dot plots representativos de negativo, simple positivo de IgA, simple positivo de IgG y de 3 ratones control.

MF, o bien que en las dos situaciones analizadas el líquido luminal (LL) esté enriquecido con distintas inmunoglobulinas que opsonizarían las bacterias del lumen. Para evaluar estas alternativas, se obtuvieron LL del colon de animales control o DSS, se filtraron para remover bacterias intestinales y conservar las inmunoglobulinas solubles, y se incubaron, en tubos diferentes, con el mismo Ag: una suspensión de bacterias de la cepa de *E. coli* – Dh5 alpha (1:1, vol:vol) para evaluar el porcentaje de bacterias recubiertas con IgA, IgG o ambas mediante citometría de flujo. La Fig. 25 muestra, en la columna de la izquierda, las bacterias *E. coli* – Dh5 alpha resuspendidas en PBS, sin el agregado de LL; la columna central corresponde a las bacterias incubadas con LL control sin diluir y la de la derecha,

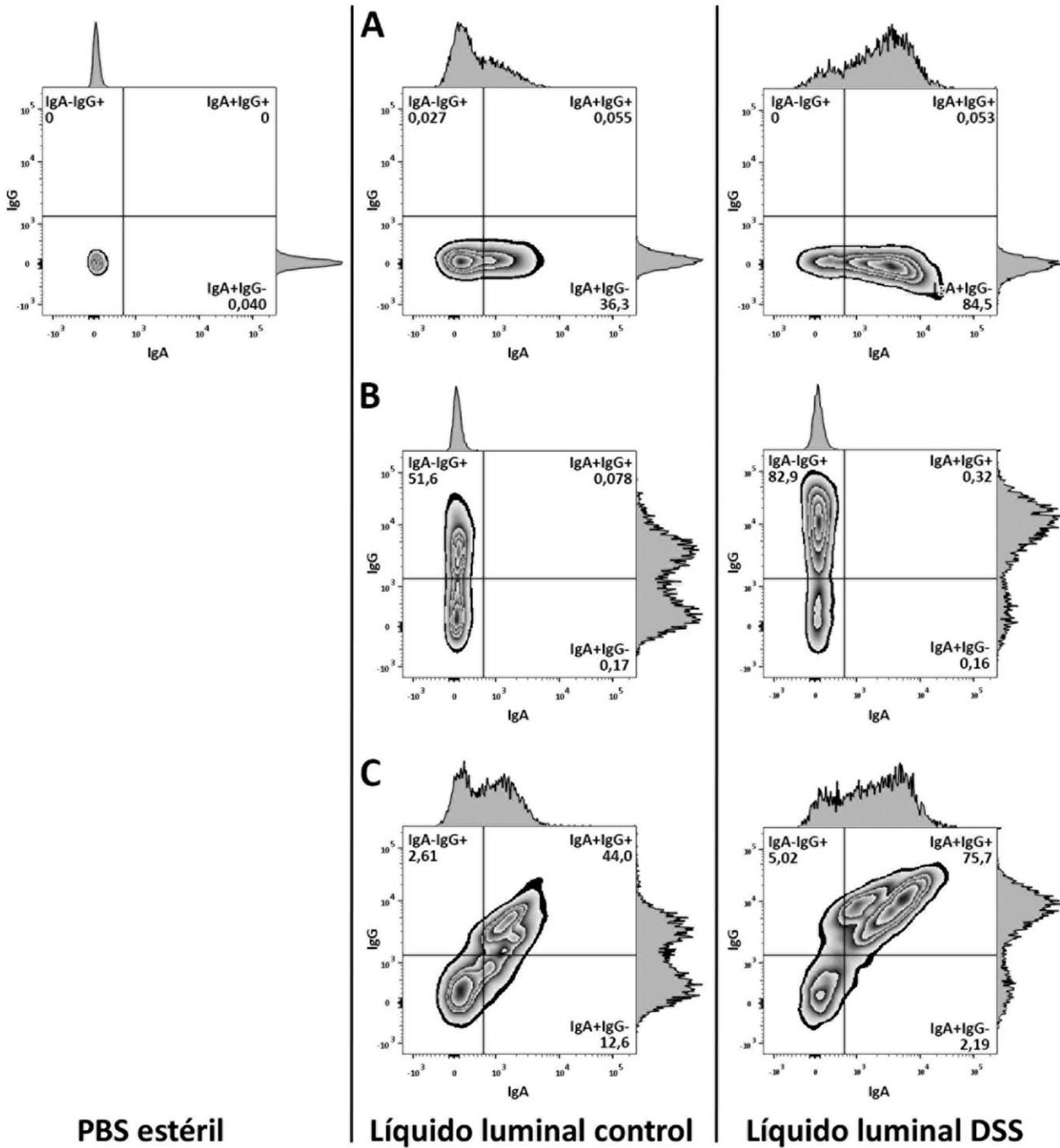


Figura 25. Evaluación del contenido de los líquidos luminales (LL) sin diluir de ratones control y DSS. Zebra plots e histogramas de *E. coli* Dh5-alpha no opsonizada u opsonizada con LL de ratones control o DSS. IgA total (superior), IgG total (medio) o ambas inmunoglobulinas simultáneamente (inferior) fueron evaluadas por citometría de flujo. Representativo de 2 experimentos diferentes.

a bacterias incubadas con LL DSS sin diluir. A su vez, se analizaron bacterias recubiertas sólo con IgA (panel A), sólo con IgG (panel B) o con ambas (panel C). En cada cuadrante se indica la frecuencia de bacterias IgA+IgG-, IgA-IgG+ o IgA+IgG+. En la representación se muestran tanto los gráficos Zebra plot como los histogramas de las marcas de IgG e IgA, pudiéndose observar las 3 poblaciones de bacterias. A partir del panel C, se pudo concluir que luego de la incubación con LL DSS se redujo marcadamente la proporción de bacterias opsonizadas sólo con IgA y aumentó el porcentaje de bacterias IgG+ y DP respecto a lo observado con LL control (**Fig. 25C**). Estos resultados muestran que la composición del LL en condiciones inflamatorias difiere en cuanto a la concentración de inmunoglobulinas que podrían opsonizar las bacterias comensales en condiciones homeostáticas y mimetizaron los hallazgos obtenidos con muestras de MF de ratones control o DSS (**Fig. 23**).

Para determinar la capacidad de opsonización de los LL control y DSS, 3 diluciones de los mismos (sin diluir, 1/10 y 1/100, vol/vol) se incubaron con la suspensión bacteriana (*E. coli* – Dh5 alpha, 1:1, vol:vol) por 30 min y se evaluó la IFM de bacterias recubiertas con IgA, IgG o ambas por citometría de flujo (**Fig. 26**). Los efectos más significativos se observaron con las bacterias opsonizadas con las dos inmunoglobulinas, respecto de aquellas opsonizadas con IgA o con IgG solamente. Para bacterias DP, la mayor opsonización (IFM) correspondió a los LL DSS sin diluir tanto para IgA como para IgG respecto a la condición control. Por otra parte, en la dilución 1/100 los LL control y DSS mostraron IFM similares para las dos inmunoglobulinas, mientras que a la dilución 1/10 o sin diluir, el LL DSS tuvo para la IgG una IFM 1,86 y 2,88 veces mayor, respectivamente, comparado con el LL control mostrando así una mayor potencia opsonizante.

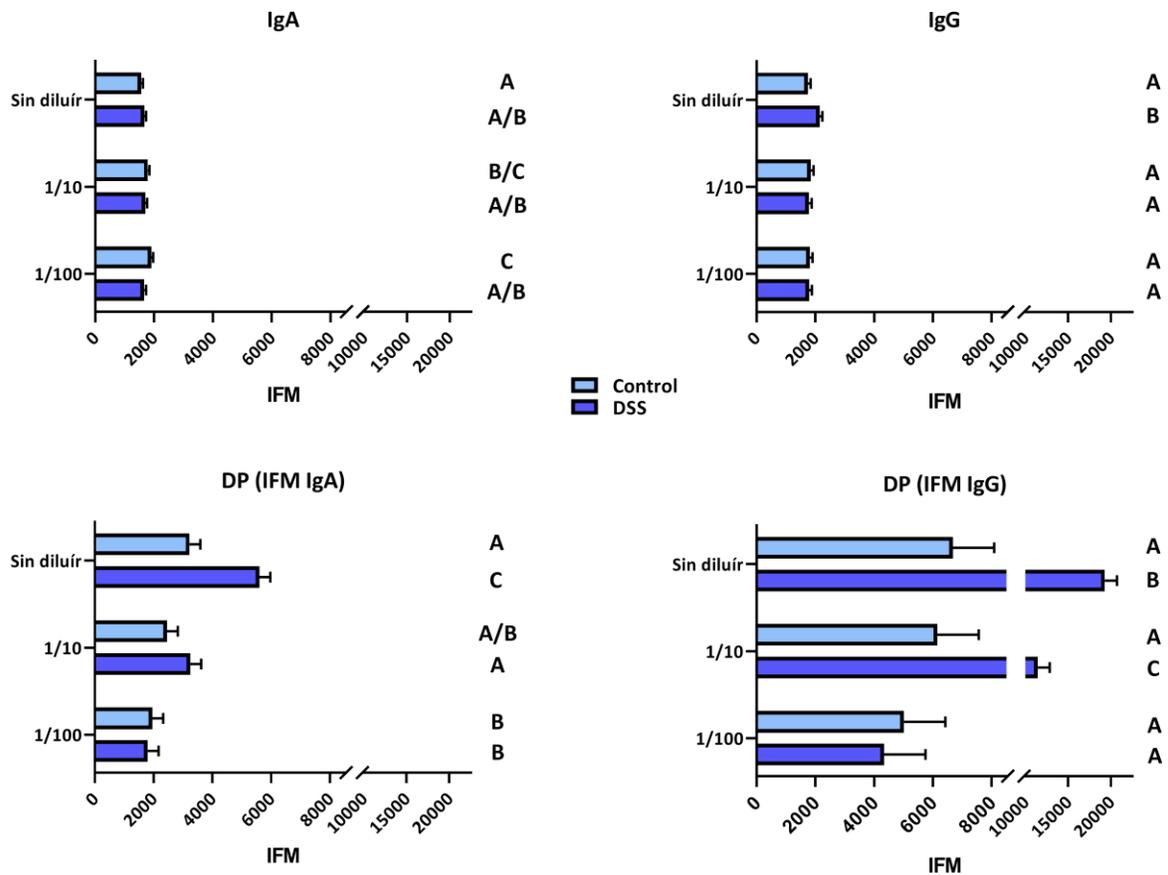


Figura 26. Capacidad opsonizante de LL de ratones control o DSS. *E. coli* Dh5-alpha opsonizadas con LL de ratones control o DSS (sin diluir, 1/10 y 1/100, vol/vol), analizadas por citometría de flujo. Intensidad de fluorescencia media de IgA (izquierda) e IgG (derecha) en bacterias simples positivas (arriba) o dobles positivas (abajo). Representativo de 2 experimentos diferentes, con n=6/grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p < 0,05$.

Hasta aquí, los estudios realizados con ratones DSS correspondieron al día 7, el momento de la finalización del protocolo; sin embargo durante la condición inflamatoria los cambios en la permeabilidad intestinal descritos en la literatura ocurren de manera más temprana (días 1-2 del protocolo) (Poritz y col., 2007) por lo que la alteración de los LL podría ocurrir antes. Para establecer cuándo se produce esa alteración se analizó la frecuencia de bacterias de MF recubiertas con IgA, IgG o ambas en ratones control o con colitis a lo largo del protocolo de administración de DSS. El seguimiento diario mostró que el incremento en la proporción de bacterias DP ya fue significativo desde el día 2 (**Fig. 27**); la frecuencia

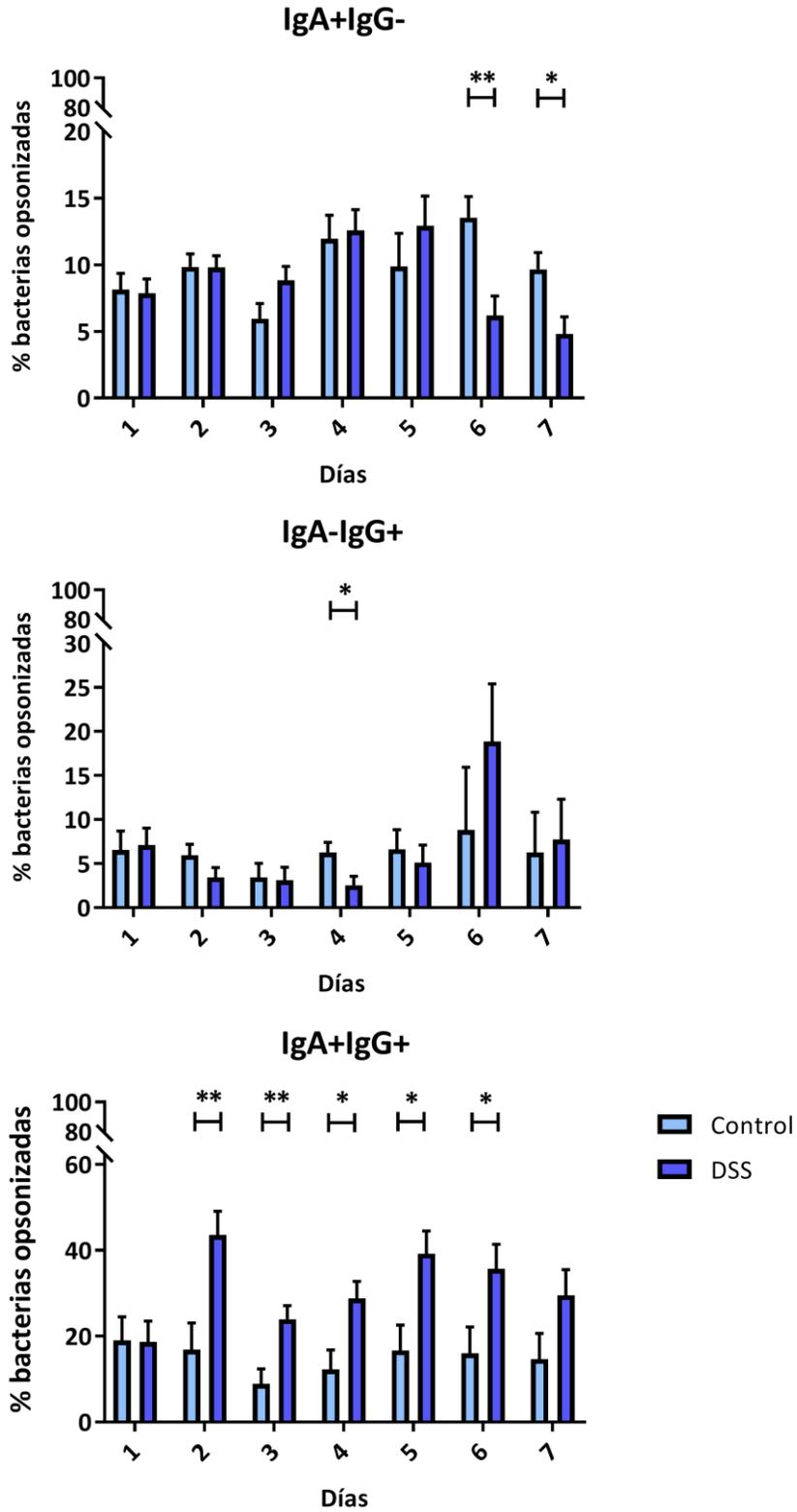


Figura 27. Evaluación del porcentaje de bacterias opsonizadas con IgA, IgG o ambas en MF durante los 7 días del protocolo experimental. MF de ratones control o DSS se analizó por citometría de flujo como se describió. Los resultados se expresaron como porcentajes y los datos son medias \pm SEM de $n=3-5$ /grupo/día. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

de bacterias opsonizadas con IgA no se vió modificada en los primeros 5 días, con valores menores al 15% , aunque en los días 6 y 7 se produjo una significativa reducción respecto de los ratones control (**Fig. 27**); finalmente, en cuanto a las bacterias IgG+, se observó una significativa disminución sólo al día 4 del protocolo (**Fig. 27**).

Para establecer si la doble opsonización de bacterias es cuali y cuantitativamente similar en localizaciones geográficas donde el clima, la alimentación y las condiciones de los bioterios son diferentes a las de Córdoba, Argentina, se realizaron experimentos en el laboratorio del Dr. Denning, en Atlanta, Estados Unidos. Empleando la sonda fluorescente SytoBC, una mezcla de colorantes empleado para la tinción y recuento de bacterias se evaluó la viabilidad

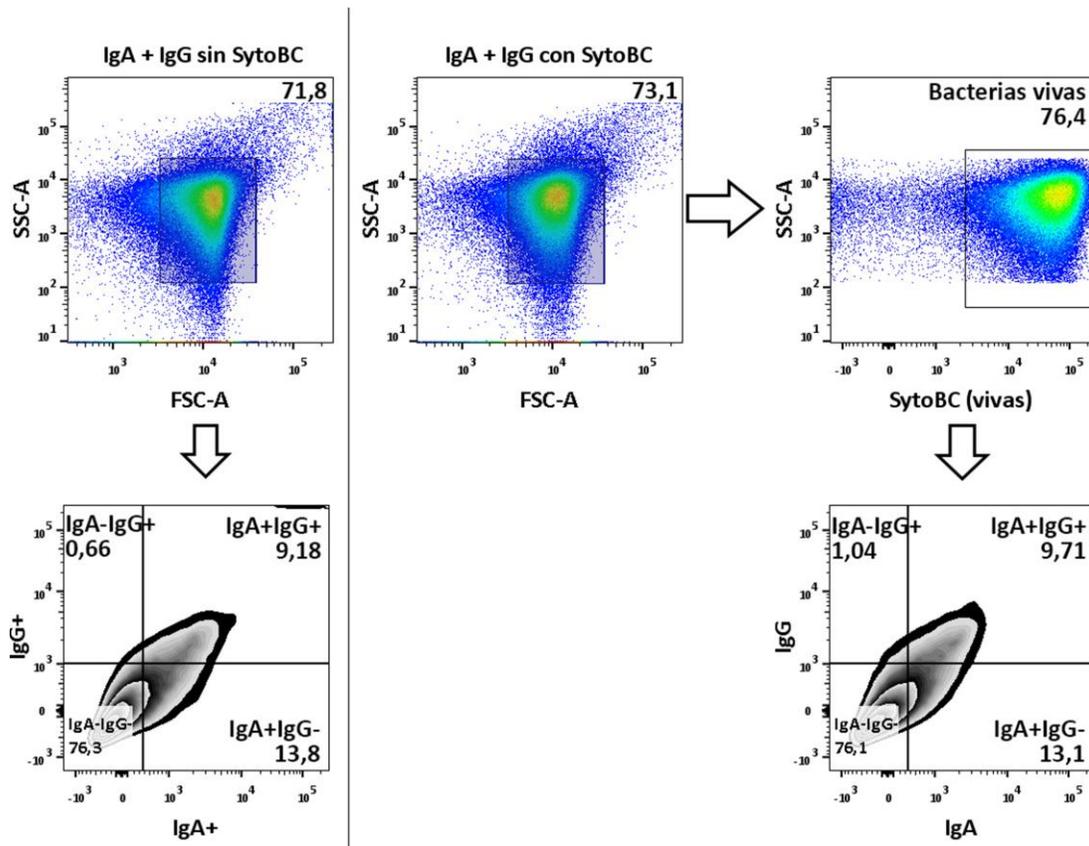


Figura 28. Estrategia de selección de bacterias viables. Dot plots representativos de muestras de bacterias de MF sin o con agregado de SytoBC para seleccionar bacterias viables (paneles superiores); zebra plots (paneles inferiores) de bacterias totales o con gate en SytoBC+ con los porcentajes de bacterias IgG+, IgA+ o DP. Representativo de 2 experimentos diferentes.

de las mismas conjuntamente con la opsonización con IgA e IgG en MF de ratones control (**Fig. 28**). Alrededor del 75% de las bacterias estaban vivas (SytoBC+, columna derecha), y esta selección (gate) arrojó porcentajes de células IgA+, IgG+, o DP similares a los obtenidos sin SytoBC (columna izquierda), la condición con la que se había trabajado en Argentina. Estos resultados validaron el protocolo utilizado en los experimentos anteriores en los que no se habían seleccionado bacterias viables antes del análisis. Por otra parte, tanto cuando se seleccionaron bacterias viables SytoBC+, como en las que no se agregó la sonda, un 75% no estuvo recubierto por anticuerpos.

Posteriormente, se realizó un análisis comparativo de muestras de MF de ratones control y DSS, previa selección de bacterias viables (**Fig. 29**). La frecuencia de bacterias IgG+, pero sobre todo IgA+, resultó muy baja, probablemente debido a las diferentes condiciones de cría de los animales. En MF de ratones DSS, la frecuencia de bacterias DP fue mayor que en MF de ratones control, con un patrón similar al observado en las muestras de animales criados en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica - CIBICI, aun cuando el porcentaje de bacterias recubiertas con inmunoglobulinas fue menor (**Fig. 29**).

A continuación, para responder si aquellas bacterias que presentaron un patrón diferente de opsonización cuando el LL es inflamatorio podrían afectar la función y/o el fenotipo de los MØs, se purificaron bacterias de MF cubiertas con inmunoglobulinas en el día 5 del protocolo de colitis por citometría de flujo. Según los requerimientos de la Comisión de Citometría del Centro de Investigación, las bacterias debieron ser fijadas previo a la purificación. La estrategia utilizada se representa en la **Fig. 30**. En primer lugar, MØs derivados de MO se incubaron por 24 hs con bacterias sorteadas, y en los sobrenadantes de cultivo se determinaron mediadores solubles. En MØs estimulados con bacterias DP de ratones DSS,

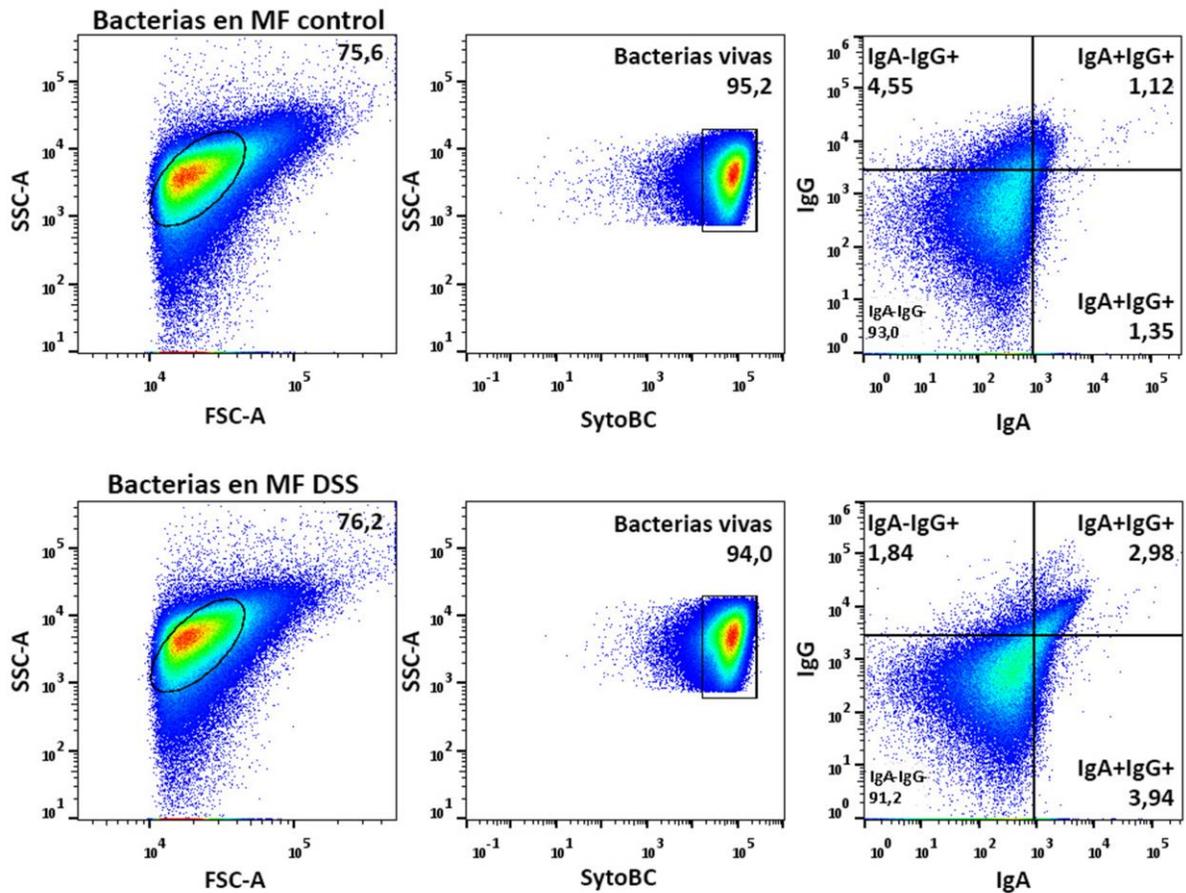


Figura 29. Evaluación de bacterias opsonizadas en ratones control y DSS provenientes de un bioterio de EEUU. Dot plots representativos de bacterias de MF de ratones control y DSS. Selección de la población (izquierda), de bacterias viables por SytoBC (medio) y patrón de opsonización con IgG e IgA (derecha).

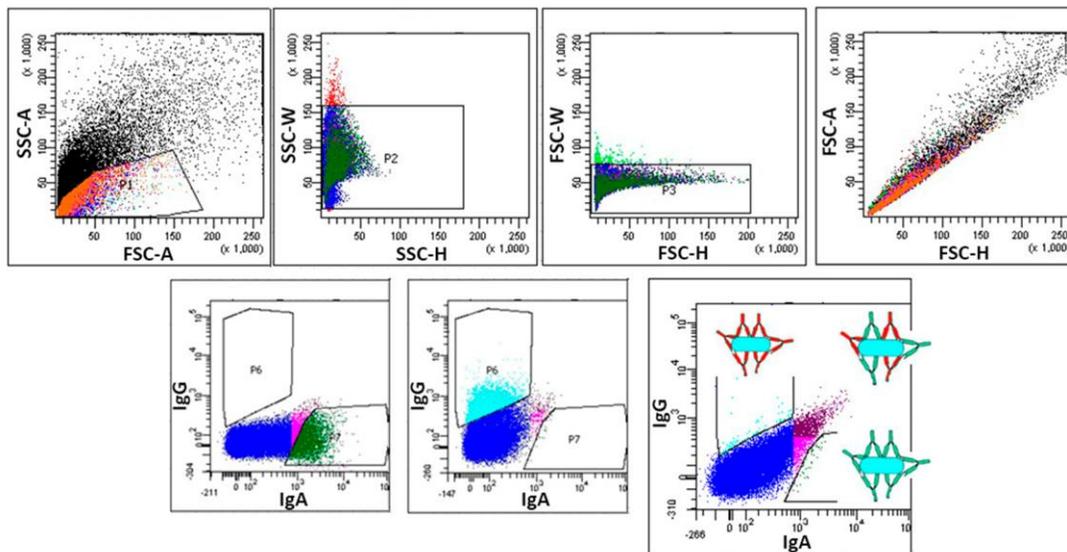


Figura 30. Estrategia de purificación de bacterias opsonizadas de MF. Luego de la inmunomarcación, las bacterias fueron fijadas y procesadas por Cell Sorting según los criterios de selección que se muestran en la figura. Se obtuvieron bacterias fijadas opsonizadas solamente con IgG, solamente con IgA, o con ambas.

se encontró una significativa producción de IL-10 y de nitritos (**Fig. 31A**). Por otra parte, con MØs F4/80+ purificados y sorteados a partir de LP de ratones control, se obtuvo el mismo resultado, con una alta producción de nitritos en los cultivos estimulados con bacterias DP de MF de ratones DSS (**Fig. 31B**).

Para conocer si la estimulación con bacterias viables opsonizadas producía resultados equivalentes, en experimentos realizados también en el laboratorio del Dr. Denning, se obtuvieron bacterias viables de MF por dos métodos diferentes: citometría de flujo y separación con perlas magnéticas. La obtención de bacterias opsonizadas con IgA por cualquiera de las estrategias resultó muy compleja y con

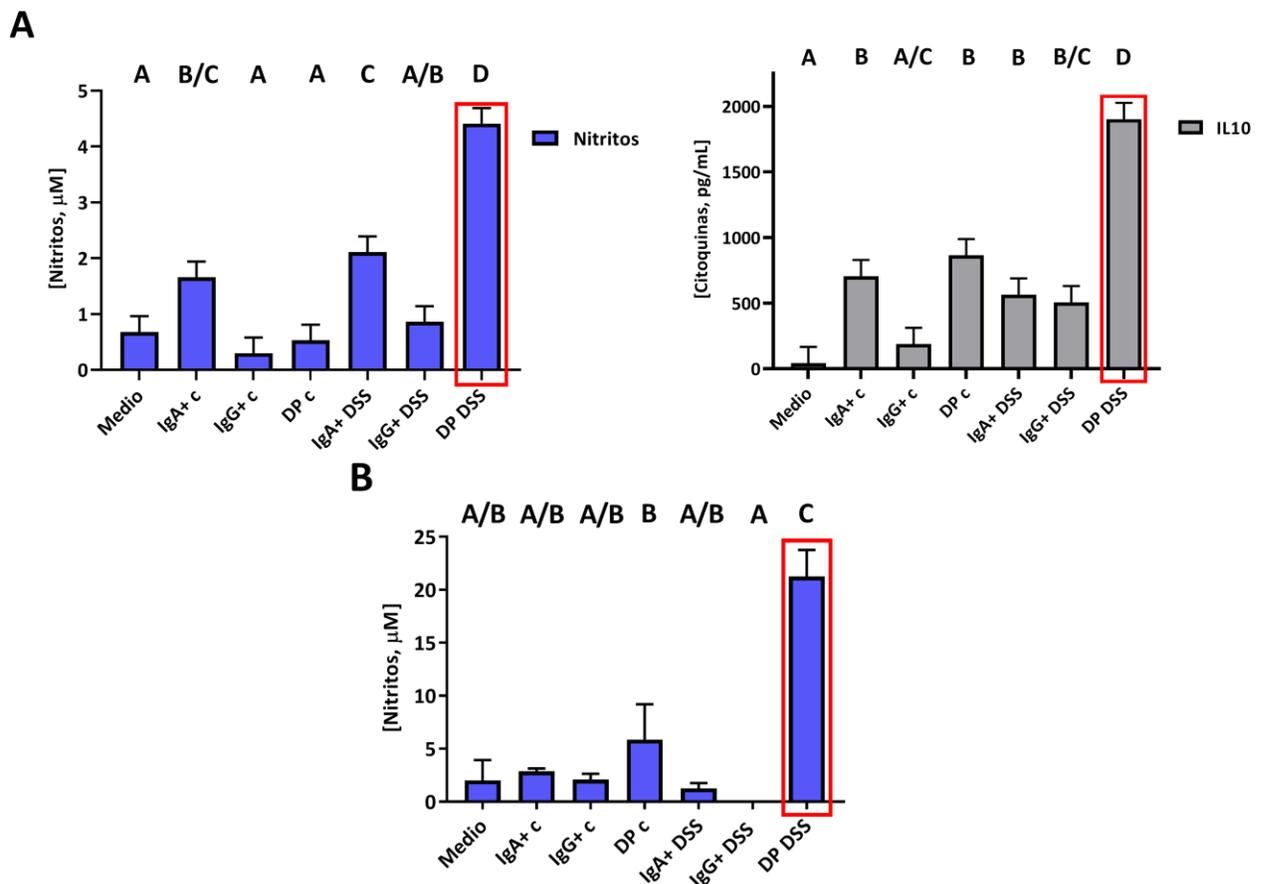


Figura 31. Evaluación de mediadores en MØs estimulados con bacterias opsonizadas. A) Producción de nitritos e IL-10 por MØs derivados de MO estimulados 24 hs con bacterias obtenidas por Cell Sorting de ratones control o DSS opsonizadas con IgA, IgG o ambas. **B)** Producción de Nitritos por MØs sorteados de LP y estimulados con bacterias obtenidas por Cell Sorting de ratones control o DSS opsonizadas con IgA, IgG o ambas. Los datos son medias \pm SEM de 2 experimentos con n=3-4/grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p < 0,05$.

un rendimiento escaso, por lo cual, a partir de la suspensión de bacterias de materia fecal de animales DSS se seleccionaron dos fracciones: IgG+ (que incluiría bacterias IgA-IgG+ e IgA+IgG+, según lo observado en la **Fig. 29**) o IgG- (que incluiría IgA+IgG- e IgA-IgG-, según lo observado en la **Fig. 29**), es decir bacterias opsonizadas o no opsonizadas con IgG. En cultivos con bacterias viables obtenidas por citometría de flujo, la producción de TNF- α y de IL-10 fue mayor en M ϕ s estimulados con la fracción IgG+ que con la fracción IgG- y con niveles muy superiores a los detectados cuando las células se incubaron con LPS (**Fig. 32**).

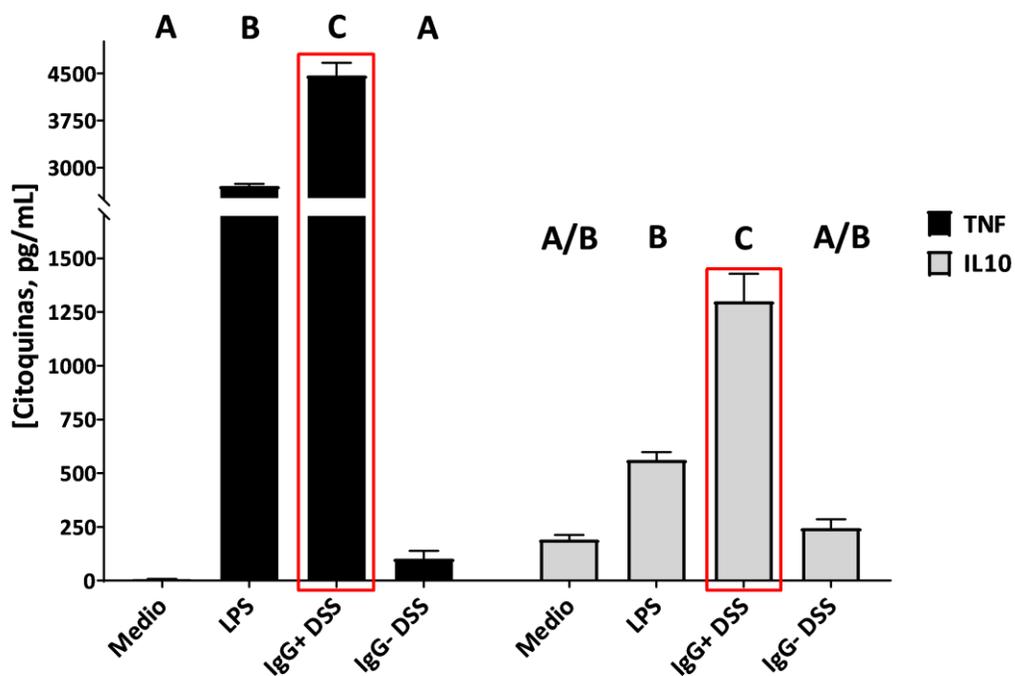


Figura 32. Estimulación de M ϕ s con bacterias viables de MF purificadas por Cell Sorting. Producción de TNF- α e IL-10 por M ϕ s derivados de MO estimulados con la fracción IgG+ o IgG- de bacterias viables de MF de ratones DSS. Como controles se utilizaron M ϕ s estimulados con medio fresco o con LPS como control positivo. Los datos son medias \pm SEM de un experimento representativo con n=4/grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a p<0,05.

En el caso de las bacterias obtenidas por separación magnética, la fracción IgG+ representó un 36% y en la fracción IgG- sólo se detectó un 2,3% de bacterias IgG+ (**Fig. 33A**). En estos experimentos la purificación de bacterias IgG+ e IgG- se hizo a partir de MF de ratones exocriados, recién entregados por el proveedor y que han

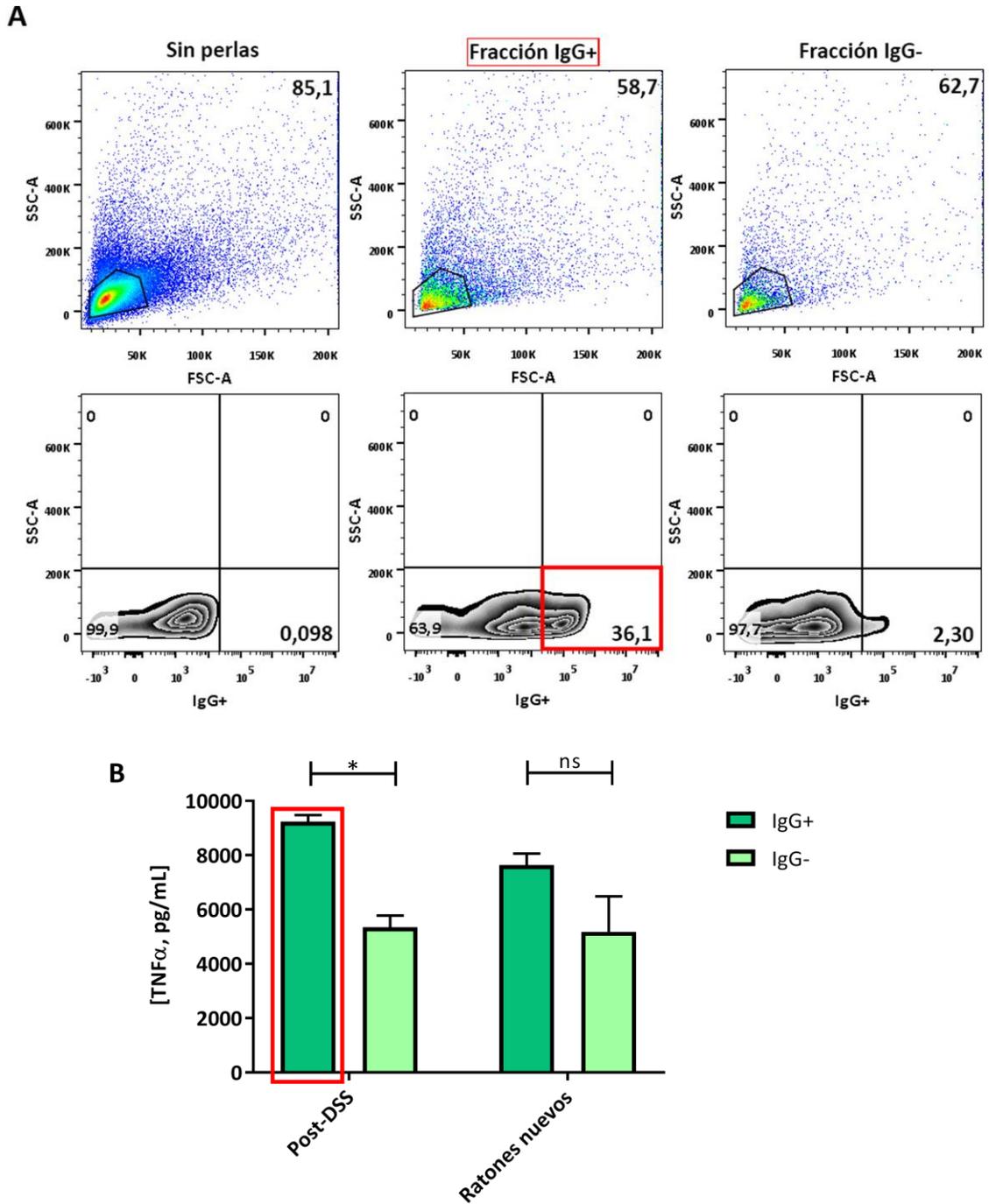


Figura 33. Purificación de bacterias viables de MF por perlas magnéticas y estimulación de MØs derivados de MO. **A)** Pureza de las fracciones IgG+ e IgG-. Selección de población por tamaño vs. granularidad y caracterización de fracciones (dot plot granularidad vs. IgG). **B)** Producción de TNF- α por MØs derivados de MO estimulados con la fracción IgG+ o IgG- de bacterias viables obtenidas por separación magnética de MF de ratones *post-DSS* o exocriados. Los datos son medias \pm SEM de 1 experimento con n=3/grupo.

tenido menor contacto con el ambiente de este bioterio; además, para evaluar si los efectos observados en la colitis aguda se resuelven o persisten en la fase de recuperación, se analizó la MF de ratones tratados con DSS por 5 días y recogida al cabo de los 21 días de iniciado el protocolo (ratones *post-DSS*). Los MØs derivados de MO y estimulados con bacterias *post-DSS* mostraron mayor producción de TNF- α cuando se cultivaron con la fracción IgG+ respecto de aquellos cultivados con la fracción IgG-, mientras que la producción de esta citoquina por MØs estimulados con bacterias fecales de ratones exocriados no mostró diferencias significativas (**Fig. 33B**).

Considerando que las diferencias en la opsonización observada en las condiciones control y DSS podrían significar cambios en la fagocitosis mediada por CD64, se evaluó la internalización de bacterias comerciales conjugadas a una sonda sensible al pH que fluoresce cuando está efectivamente en fagosomas (*E. coli* pHrodo Green, Thermofisher) preincubadas con LL control o DSS (**Fig. 34A y B**), y el anticuerpo que bloquea los otros receptores de la IgG de baja afinidad (Fc blocker). De esta manera, las células que se detectan fluorescentes por citometría de flujo, son aquellas que efectivamente internalizaron bacterias a través del Fc γ RI. Luego de 90 min (el tiempo recomendado por el proveedor), sin importar el origen de los MØs (sorteados de ratones control o DSS), la fagocitosis fue mayor con bacterias opsonizadas con LL control que con LL DSS (**Fig. 34C**). A raíz de este sorprendente resultado la siguiente pregunta fue si la diferencia en la fagocitosis podría ser consecuencia del tiempo en que era medida. Para ello, en un nuevo experimento y en las condiciones previamente establecidas, la incorporación de bacterias sensibles al pH se evaluó a los 30 y 60 min. Curiosamente, a tiempos más cortos, la fagocitosis estuvo incrementada en MØs que, sin importar su origen, fueron estimulados con bacterias opsonizadas con LL DSS, siendo significativamente diferente a los 60 min (**Fig. 34D**).

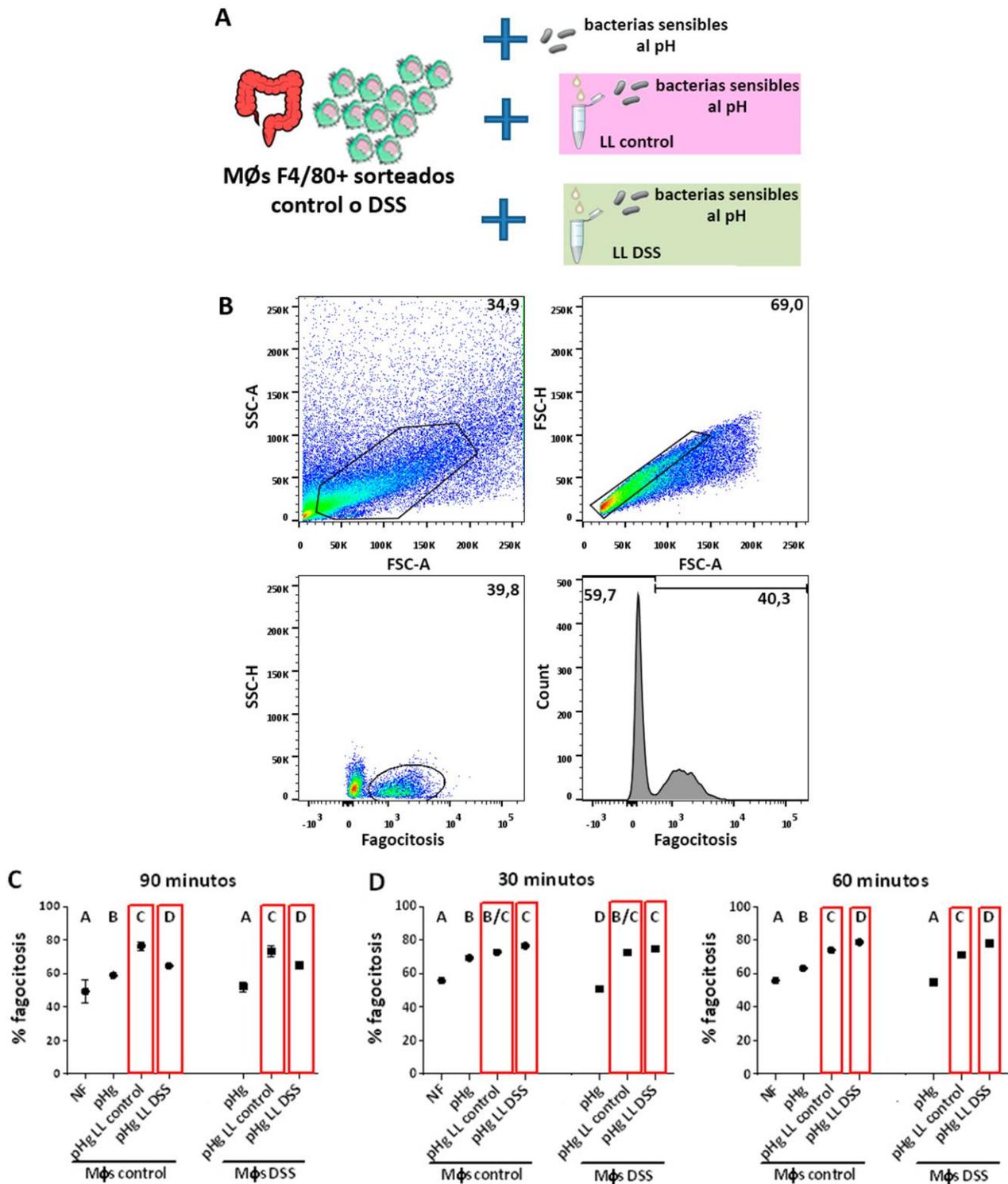


Figura 34. Fagocitosis de bacterias sensibles al pH osonizadas con LL control y DSS. A) Esquema experimental de la evaluación de fenotipo y fagocitosis de Mφs F4/80+ control y DSS sorteados y estimulados con bacterias sensibles a pH, solas o preincubadas con LL control o DSS, respectivamente. **B)** Estrategia de gating, selección de población (tamaño vs. granularidad), singletes e identificación de bacterias fagocitadas. **C)** Evaluación de fagocitosis a 90 min. **D)** Cinética de fagocitosis a 30 y 60 min. Los datos son medias \pm SEM de un experimento representativo con $n=3$ /grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a $p<0,05$.

Dado que, independientemente del origen de los MØs, las diferencias en fagocitosis estuvieron determinadas por los LL usados para opsonizar las bacterias pHrodo Green, se analizó la expresión del CD64, un receptor involucrado en este proceso, tanto en MØs F4/80+ de animales control como con protocolo DSS. Notablemente, luego del estímulo con bacterias opsonizadas con LL control o DSS, y, en menor proporción, con bacterias no-opsonizadas, se observaron dos poblaciones claramente distinguibles en base a la IFM que fueron clasificadas como

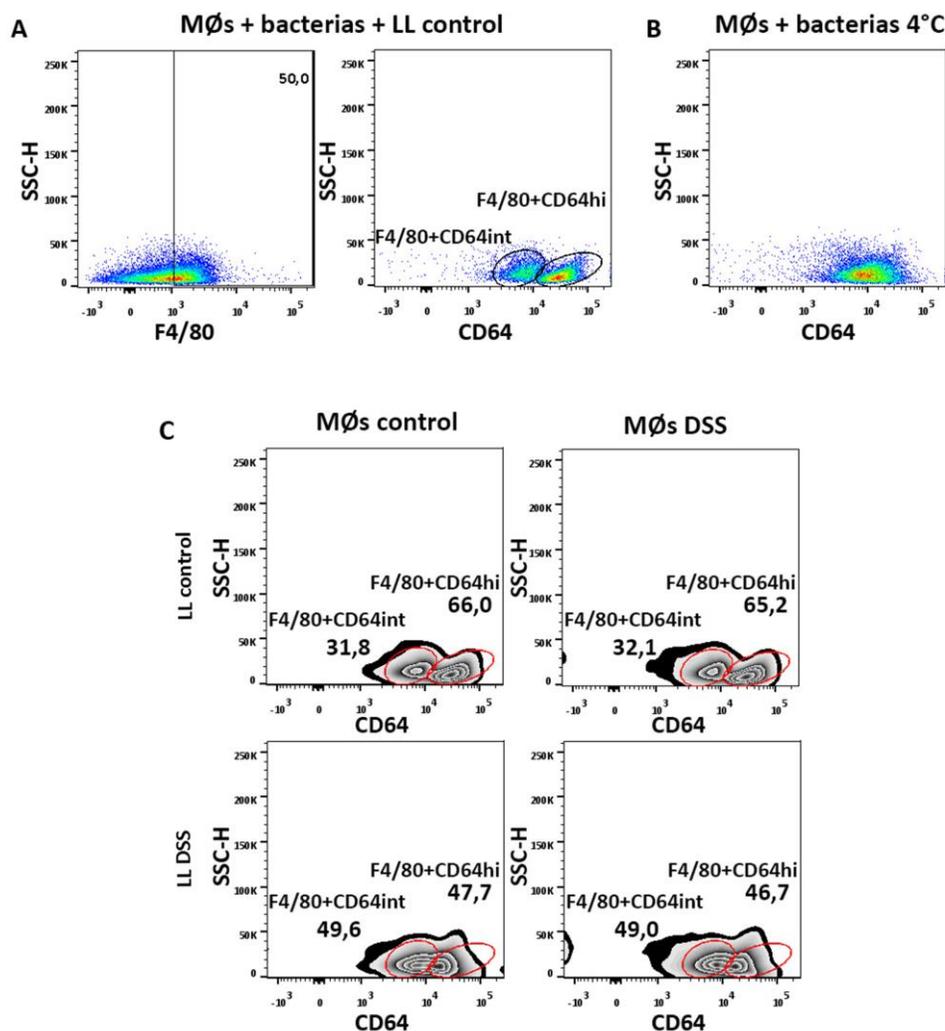


Figura 35. Expresión de CD64 en poblaciones de MØs F4/80+, purificados de animales control o con colitis, luego del estímulo con bacterias incubadas con LLs. **A)** Dot plots representativos de MØs estimulados con bacterias opsonizadas con LL control por 60 min. División de la población F4/80+ en CD64^{hi} y CD64^{int}; **B)** Dot plot representativo de MØs F4/80+ en condiciones desfavorables para la fagocitosis (4°C). **C)** Zebra plots representativos de la expresión de CD64 en MØs F4/80+ control y DSS estimulados con bacterias opsonizadas con LL control y DSS.

“high” e “intermedia” (CD64^{hi} y CD64^{int}). Esta partición no se detectó con MØs estimulados con bacterias a 4°C (control de no-fagocitosis), ni cuando se analizó el marcador F4/80+ (Fig. 35A).

A partir de este hallazgo, se reevaluó el porcentaje de CD64^{hi} y CD64^{int} en todas las condiciones estudiadas y los resultados se representaron como frecuencia de MØs F4/80+CD64^{hi} y F4/80+CD64^{int} en condiciones poco favorables para la fagocitosis (barras color gris), provenientes de animales control (barras color rosa) o provenientes de animales con colitis (barras color verde) estimulados con bacterias no opsonizadas o preincubadas con LL control o LL DSS, y se obtuvieron las siguientes conclusiones (Fig. 36):

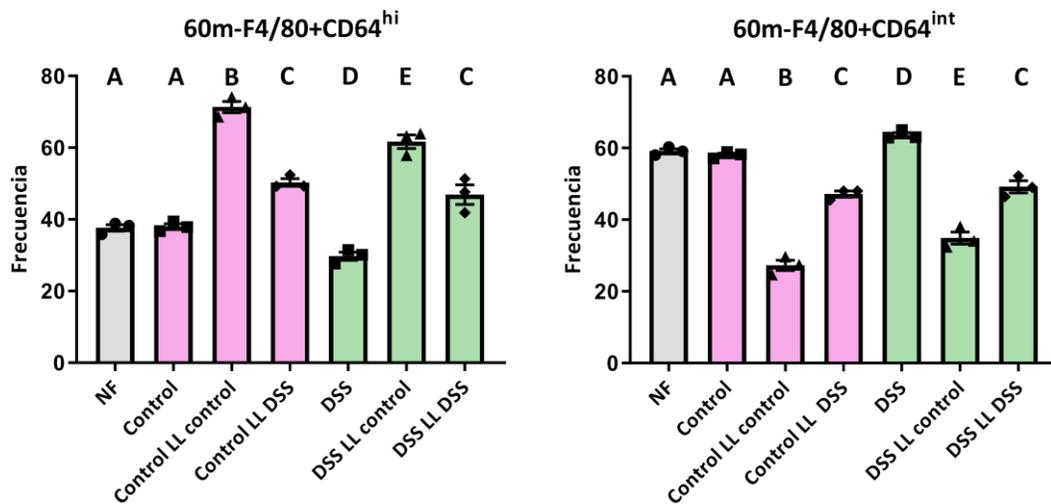


Figura 36. Cambios en la expresión de CD64 luego de la estimulación con bacterias opsonizadas Frecuencia de MØs F4/80+CD64^{hi} y F4/80+CD64^{int} en condiciones poco favorables para la fagocitosis (NF, 4°C); MØs control (barras rosas) y MØs DSS (barras verdes) estimulados con bacterias no opsonizadas o preincubadas con LL control o LL DSS. Los datos son medias ± SEM de dos experimentos representativos con n=3/grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a p<0,05.

- Cuando las condiciones no fueron óptimas (4°C), o cuando las bacterias no se incubaron con LLs, se observó mayor proporción de células F4/80+CD64^{int} (60%).

- En MØs control o DSS estimulados con LL control, la frecuencia de células F4/80+CD64^{hi} incrementó significativamente a la vez que disminuyó la proporción de células F4/80+CD64^{int}.
- En MØs control o DSS estimulados con LL DSS, la frecuencia de células F4/80+CD64^{hi} fue intermedia y significativamente diferente del LL control.

A continuación, habiendo establecido cómo la opsonización de bacterias con distintos LL afecta la expresión del CD64 en MØs control y DSS, se analizó la actividad fagocítica de estas dos poblaciones (evidenciada por las bacterias pHrodo Green a pH ácido dentro de los lisosomas) en las condiciones experimentales planteadas. Los resultados se representaron como frecuencia de células F4/80+CD64^{hi} y F4/80+CD64^{int} que presentaron actividad fagocítica (medida como fluorescencia verde) en condiciones poco favorables para la fagocitosis (barras color gris), provenientes de animales control (barras color rosa) o provenientes de animales con colitis (barras color verde) estimulados con bacterias no opsonizadas o preincubadas con LL control o LL DSS. Las células F4/80+CD64^{hi} presentaron la mayor capacidad fagocítica en todos los casos, mientras que las células F4/80+CD64^{int} tuvieron menor respuesta frente a los estímulos. De manera interesante, esta población celular incrementó selectivamente su capacidad fagocítica sólo cuando las bacterias estuvieron opsonizadas con el LL DSS (**Fig. 37**).

Finalmente, considerando el incremento en MF de bacterias IgA+IgG+ observado en la condición DSS respecto de la condición control, descrito en los primeros experimentos del presente capítulo (**Tabla 1, Figs. 23 y 27**), la mayor potencia de los LL DSS (**Fig. 26**) y su capacidad de estimular la fagocitosis de MØs CD64^{hi} y CD64^{int} (**Figs. 34D y 37**), se investigó si los efectos observados con bacterias DP podrían deberse a la estimulación simultánea de otros receptores además del CD64. No hay homólogo para el receptor de la porción Fc de la IgA

(Fc α R o CD89) en ratones (Smith y col., 2001) pero existe evidencia de que Dectina-1 podría ser un receptor involucrado en la transcitosis inversa de CIs con IgAs (Rochereau y col., 2013) y que reconoce N-glicanos conteniendo fucosas de la IgG (Manabe y col., 2019). Por lo tanto, se realizaron experimentos de fagocitosis de partículas sensibles al pH con ratones deficientes en Dectina-1 (Dectina-1 KO), para establecer la participación de este receptor en los efectos observados. Se sortearon MØs de LP de ratones Dectina-1 KO y fueron estimulados por 60 min con bacterias sin opsonizar u opsonizadas con LL control o DSS. Llamativamente, en estos MØs que no pueden interactuar con azúcares de la IgA y la IgG, el agregado de bacterias opsonizadas con LL DSS produjo un modesto aumento en la frecuencia de células CD64^{hi}, respecto del LL control en contraposición a lo observado en MØs WT (**Fig. 38**), aunque dichas células resultaron ser las de menor capacidad fagocítica. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas con respecto a

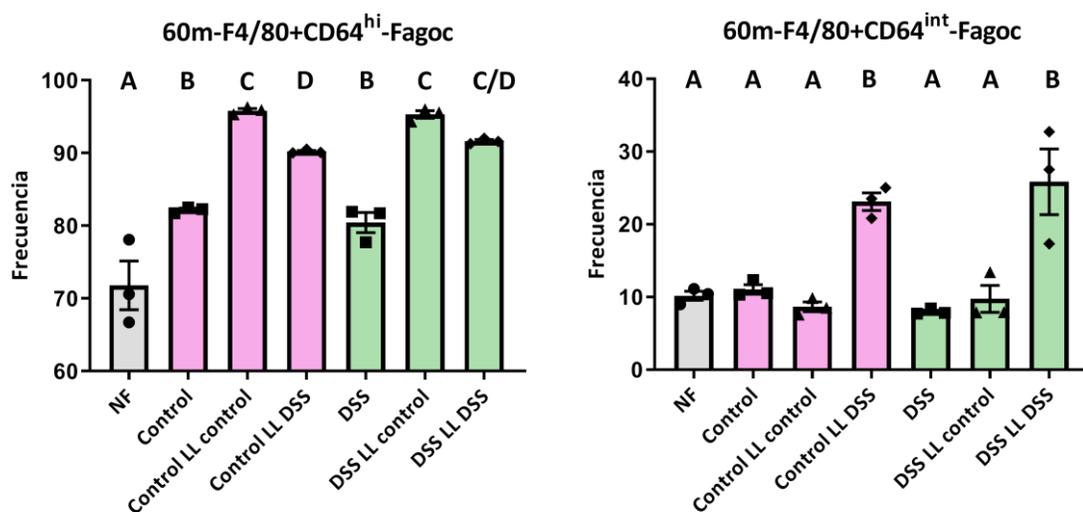


Figura 37. Análisis de la fagocitosis de bacterias sensibles al pH por MØs F4/80+CD64^{hi} y F4/80+CD64^{int}. Se evaluó la frecuencia de células fagocíticas en condiciones poco favorables para la fagocitosis (NF, 4°C), en MØs control (barras rosas) y en MØs DSS (barras verdes) estimulados con bacterias no opsonizadas o preincubadas con LL control o LL DSS. Los datos son medias \pm SEM de dos experimentos representativos con n=3/grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a p<0,05.

la frecuencia de células CD64^{int} y, contrariamente a lo que sucedió con MØs WT, la incubación con LL DSS no incrementó la capacidad fagocítica de las mismas, indicando que los efectos observados en los experimentos de fagocitosis con pHrodo Green con esta subpoblación CD64^{int} involucran Dectina-1 que mediaría principalmente la interacción con IgA (sin excluir posibles contactos con IgG), aunque se requieren estudios en mayor profundidad para establecer su exacta contribución.

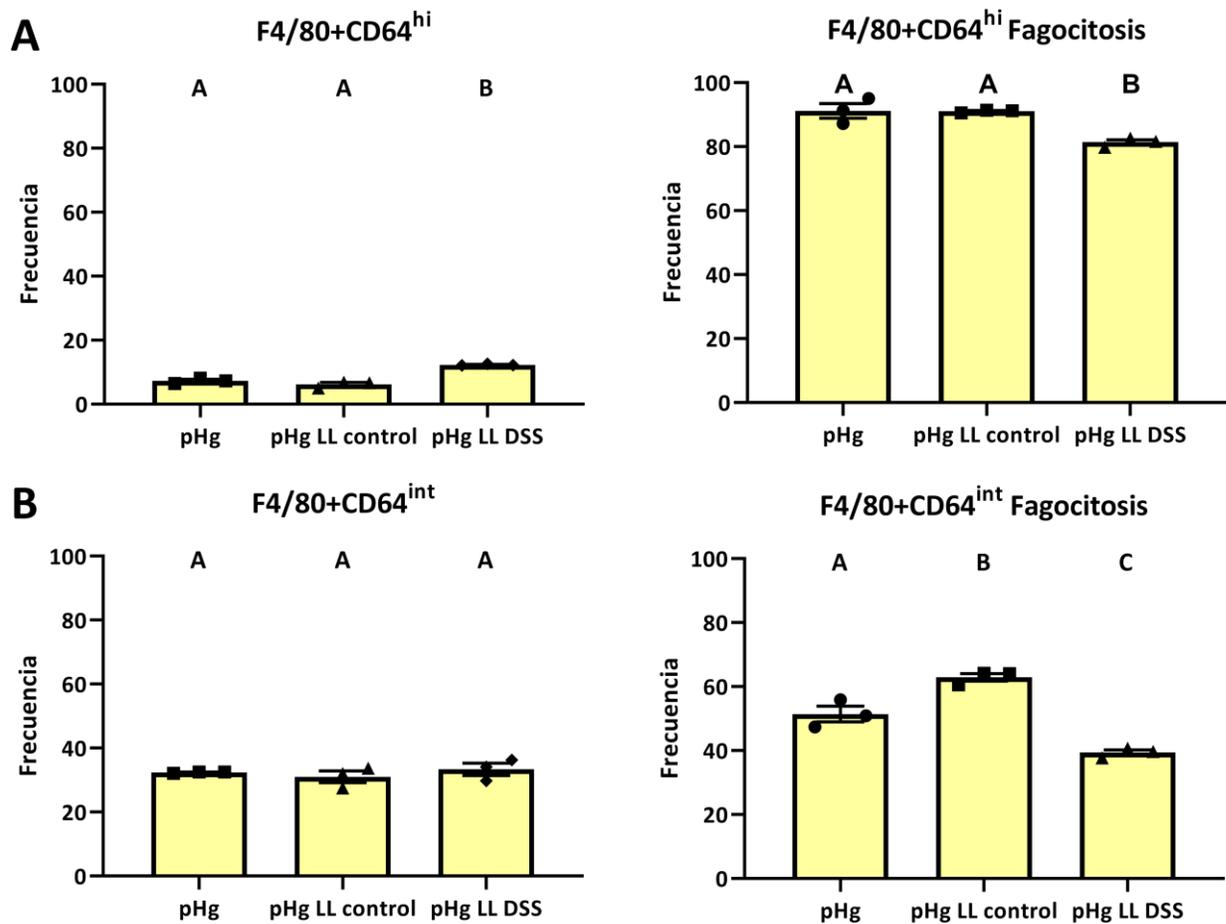


Figura 38. Análisis de la fagocitosis de bacterias opsonizadas en MØs sorteados de ratones Dectina-1 KO. A) Frecuencia de MØs F4/80+CD64^{hi} y fagocitosis de bacterias pHrodo Green no opsonizadas o preincubadas con LL control o DSS. **B)** Frecuencia de MØs F4/80+CD64^{int} y fagocitosis de bacterias pHrodo Green no opsonizadas o preincubadas con LL control o LL DSS. Los datos son medias ± SEM de dos experimentos representativos con n=3/grupo. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas, letras diferentes equivalen a p<0,05.

Como conclusiones parciales de los experimentos descriptos en el Capítulo II, podemos mencionar las siguientes:

- Las bacterias de MF de ratones DSS están opsonizadas en mayor medida con IgA + IgG (DP) con respecto a las bacterias de MF de ratones control. Este porcentaje en ratones μ MT, no fue nulo rondando el 7%.
- Cuando bacterias *E. coli* – Dh5 alpha fueron incubadas con LL control y LL DSS, el % cubierto de IgA total, IgG total y DP fue siempre mayor en el último caso. Además, la capacidad opsonizante del LL DSS sin diluir fue mayor que la del LL control
- Los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Denning en Atlanta con bacterias viables validaron los protocolos experimentales utilizados en nuestro laboratorio (Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI-CONICET), arrojando patrones similares de bacterias opsonizadas con IgA, IgG o ambas, en MF de ratones controles y colitis.
- El seguimiento diario de bacterias de MF en ratones con colitis, mostró que ya desde el día 2 existe un aumento significativo de bacterias opsonizadas con IgA e IgG, respecto de ratones control.
- En MØs de MO, el estímulo con bacterias DP fijadas y sorteadas provenientes de animales con colitis aumentó significativamente la producción de nitritos e IL-10, en tanto que incrementó la producción de nitritos en MØs sorteados de LP.
- En MØs de MO, el estímulo con bacterias IgG+ viables obtenidas de MF a través de citometría de flujo incrementó la producción de TNF- α e IL-10 a niveles mayores que los inducidos por el agregado de LPS.
- En MØs de MO, el estímulo con bacterias IgG+ viables obtenidas de MF de animales exocriados o *post-DSS* a través de separación con perlas magnéticas incrementó la producción de TNF- α .

- En experimentos con bacterias sensibles al pH, a los 90 min la fagocitosis fue mayor cuando las mismas fueron incubadas con LL control, sin importar el origen de los MØs. Sin embargo, a los 60 min la fagocitosis fue mayor cuando las bacterias fueron incubadas con LL DSS, aún sin importar el origen de los MØs.
- Se observó la partición de la población de células F4/80+ en CD64^{hi} y CD64^{int} luego del agregado de bacterias incubadas con LL control, y en menor medida, con LL DSS.
- A 4°C, o cuando las bacterias no fueron incubadas con LL, hubo mayor frecuencia de células CD64^{int}.
- Con LL control, aumentó significativamente la población CD64^{hi}, en detrimento de la CD64^{int}.
- Con LL DSS las poblaciones CD64^{hi} y CD64^{int} tuvieron proporciones equivalentes.
- En cuanto a la fagocitosis, las células CD64^{hi} mostraron la mayor capacidad fagocítica en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, las células CD64^{int} incrementaron su capacidad fagocítica sólo luego de ser estimuladas con bacterias incubadas con LL DSS.
- En MØs Dectina-1 KO, la estimulación con LL DSS produjo un modesto aumento en la frecuencia de células CD64^{hi}, aunque mostraron menor capacidad fagocítica. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células CD64^{int} y el LL DSS no incrementó su capacidad fagocítica, sugiriendo que esta molécula participaría en la internalización de las bacterias DP.

Discusión

La inmunología de la mucosa intestinal es clave para la generación de la tolerancia hacia antígenos de la dieta y de las bacterias comensales (Tordesillas y col., 2018). En los últimos años, su comprensión ha experimentado una enorme expansión como consecuencia de las nuevas herramientas metodológicas y del significativo volumen de hallazgos sobre la microbiota intestinal, su actividad metabólica y especialmente la caracterización de productos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y metabolitos derivados del triptofano, moléculas que resultan esenciales para la homeostasis (Matteoli y col., 2010). Aún así, debido a la magnitud y diversidad de mediadores, células y funciones, muchos mecanismos homeostáticos y patológicos permanecen desconocidos. En este trabajo de Tesis se dilucidan algunos aspectos de la función de los MØs intestinales que expresan CD64, el receptor de alta afinidad para la porción Fc de la IgG. La relevancia de estos aportes se evidencia al explorar la base de datos especializada en salud PubMed, en donde, en los últimos 10 años, aparecen 185 referencias bibliográficas referidas a CD64 y MØs (PubMed *CD64 and macrophages*), y sólo un 10% se refiere a MØs intestinales. Más aún, todavía no se cuenta con un análisis exhaustivo de la expresión del FcγR en MØs humanos, en las diferentes regiones anatómicas del intestino, en condiciones de salud y enfermedad (Castro-Dopico y Clatworthy, 2019).

Los experimentos de fenotipificación de los MØs intestinales murinos mostraron que en la LP del colon, de las células seleccionadas con el marcador F4/80+, un 40% expresa CD64 y Ly6c y un 55% expresa moléculas CMH-II. Este fenotipo es similar al descrito por otros autores para células de la LP, caracterizadas por altos niveles de expresión del receptor CD64 y de las moléculas F4/80, CMH-II y CX₃CR1, el receptor de la fractalquina, que confiere a estas células la propiedad de elongar protusiones a la luz intestinal para captar Ags (Schulz y col., 2009; Bain y col., 2013). Tamoutounour y col. (2012), describieron que todas las

células CX₃CR1⁺ de la LP expresan también CD64, CMH-II y niveles bajos a nulos de CD11c (considerado un marcador de linaje de las células dendríticas), mientras que monocitos recientemente extravasados desde la sangre hacia la LP tienen alta expresión de Ly6c. Los MØs que residen en los tejidos constituyen una población muy heterogénea en términos de ontogenia, morfología, fenotipo, metabolismo y función. En las condiciones inflamatorias de nuestro modelo de colitis inducida por DSS, las células de la LP de colon seleccionadas como F4/80⁺ mostraron menor expresión de los marcadores CD64 y Ly6c. Este fenómeno también se reprodujo en experimentos de transferencia adoptiva de células mononucleares de MO, evidenciando que la modulación de estos marcadores se debe a señales en el microambiente mucoso más que a características intrínsecas de las células. De manera similar, en experimentos de transferencia adoptiva de células de donadores WT a ratones receptores carentes de IL-6 (datos no mostrados), los cambios en CD64 y Ly6c fueron similares en las condiciones control y DSS, confirmando que la ausencia de IL-6 durante la inflamación impidió la modulación del fenotipo de MØs de la LP colónica. Esto se debe a que los factores microambientales específicos son los que confieren propiedades a los MØs y definen su estado de activación, regulando dinámicamente el “switch” fenotípico y funcional en un continuo que va desde MØs clásicos inflamatorios M1 a MØs alternativos M2 (Zhou y col., 2014). Las diferencias en las características de los MØs en la homeostasis y la inflamación muestran la naturaleza versátil de estas células, que aunque se describan como MØs intestinales, en realidad comprenden subconjuntos heterogéneos con plasticidad de adoptar diversos fenotipos según el microambiente, lo que ha sido descrito en otros órganos como el hígado (Tacke y Zimmermann, 2014).

Inicialmente, los MØs se identificaron por la expresión de CD11b, una molécula que también se encuentra en neutrófilos, células NK, células dendríticas y linfocitos B. En 1981 se describió el marcador F4/80, una molécula de superficie

bastante específica de MØs murinos presente en las cepas más comunes criadas en bioterios (Warschkau y Kiderlen, 1999). Experimentos de estos autores mostraron que la expresión de F4/80 no es homogénea y es prescindible para el desarrollo y funciones de los MØs. La presencia de subpoblaciones con distintos niveles del marcador en un mismo tejido podría significar que la heterogeneidad depende del estado de activación de los MØs. Por esta razón, en el estado estacionario en distintos tejidos podrían coexistir subpoblaciones con expresión diferencial de F4/80 (Dos Anjos Cassado, 2017). En parte por este motivo, la fenotipificación de los MØs intestinales además de marcadores como CD11b y F4/80 debe incluir otras moléculas. Como se mencionó, según el modelo de la cascada, los monocitos frescos van cambiando paulatinamente su fenotipo al ingresar a la LP en condiciones homeostáticas y este mecanismo se altera durante la inflamación (Tamoutounour y col., 2012; Bain y col., 2013). Se ha propuesto que el bloqueo en la vía de diferenciación puede ser resultado de la capacidad de los MØs inflamatorios de responder a la estimulación de TLRs como consecuencia del ingreso masivo de ligandos durante la colitis por DSS (Grainger y col., 2017). En cuanto al significado de la expresión sostenida, reducida o aumentada de los marcadores empleados en la caracterización realizada en este trabajo, en otros modelos inflamatorios se ha observado que la expresión de F4/80 en MØs mantiene los niveles detectados en el estado estacionario (Ramachandran y col., 2012), mientras que el marcador Ly6c disminuye. Es más, el fenotipo con baja expresión de Ly6c (Ly6c^{lo}) y una alta actividad fagocítica serían indicadores de que los monocitos infiltrantes tempranos han adquirido la capacidad de restaurar el tejido (MØs restauradores), con competencia para resolver la fibrosis y degradar la matriz extracelular (Tacke y Zimmermann, 2014). Por otra parte, la adopción de un fenotipo u otro dependería del momento en que se produce el reclutamiento de los monocitos Ly6c⁺ durante el curso de la reacción inflamatoria, ya que el ingreso

al tejido en etapas avanzadas (por ejemplo día 5, como se realizó en los experimentos de la presente Tesis) puede favorecer un fenotipo restaurador (Zigmond y col., 2012). En cuanto al marcador CD64, se observaron cambios en su expresión en la condición homeostática vs. la inflamación intestinal. Es interesante que estos cambios coinciden con los reportados por Tamoutounour y col. (2012), a pesar de las diferencias en los modelos. El protocolo de inflamación intestinal usado por estos autores involucra la inmunidad adaptativa y dura aproximadamente 21 días mientras que los experimentos aquí descritos tuvieron foco en la inmunidad innata con un modelo de colitis aguda de 7 días. Las células transferidas en ambos casos también fueron diferentes (MØs CD64+ de GLM en un caso y células mononucleares de MO en el otro) así como los tiempos de estudio post-transferencia (una semana vs. dos días). Aún así, los resultados de los dos grupos demostraron que la expresión de la molécula CD64 observada en la condición homeostática sufre una disminución durante la colitis aguda o crónica, posiblemente debido a una mayor actividad endocítica en el tejido lesionado. Esta posibilidad se fundamenta en resultados previos que muestran que cuando los monocitos son tratados con CIs durante dos días, hay una marcada disminución del FcγRI (Laborde y col., 2007), lo que se explicaría porque la elevada afinidad por la IgG (10 a 100 veces mayor que otros FcR) determina una estimulación temprana, con internalización de los CIs, procesamiento y posterior presentación de los Ags (Barnes y col., 2002), todos eventos esperables en el contexto de la lesión colónica. Por otra parte, si bien ambos subtipos expresan CD64, los MØs M1 tienen reducida actividad de proteasas endosómicas, lo que limita la degradación proteolítica después de la internalización a través de CD64 (Hristodorov y col., 2015).

En este trabajo, también se observó que cuando las células de MO se transfirieron en condiciones homeostáticas, se reclutaron prevalentemente en la LP; en condiciones inflamatorias en cambio, las células se redistribuyeron hacia

otros órganos linfoides como los GLM y los GLI, perdiendo su tropismo por el tejido colónico. Las células mononucleares de la MO representan una población heterogénea que podría tener diferentes papeles durante la homeostasis, la inflamación y la reparación de tejidos y cuyo papel fisiológico no está completamente definido. La proporción de los subconjuntos de monocitos es distinta, y en ratón, aquellos con fenotipo clásico Ly6c⁺ representan sólo el 60% de los monocitos en sangre (Italiani y Boraschi, 2014). Es interesante destacar que los monocitos clásicos son reclutados principalmente a través de CCR2, mientras que los monocitos no clásicos utilizan una vía dependiente de CX₃CR1, el receptor empleado para describir el modelo de cascada (Tacke y col., 2007). Se considera que, en condiciones homeostáticas, los monocitos circulantes contribuyen a la repoblación de los MØs residentes de la LP del intestino (Italiani y Boraschi, 2014). Sin embargo, durante la inflamación, se potencia su capacidad de captar Ags y recircular al tejido linfoide para la presentación antigénica (Jakubzick y col., 2013). Empleando el modelo agudo de colitis, se demostró que los monocitos Ly6c⁺ que infiltran la LP del colon, en lugar de diferenciarse a MØs residentes como en el tejido sano, generan células efectoras capaces de captar y procesar Ags adquiridos por vía oral y de emigrar desde la LP hacia los GL (Zigmond y col., 2012). Si bien no existe un consenso absoluto, el reclutamiento de monocitos clásicos Ly6c⁺ dominaría en algunas respuestas inflamatorias según lo observado en modelos de peritonitis estéril, piel o músculo esquelético injuriados y estarían aumentados en la circulación durante la infección sistémica o crónica (Ingersoll y col., 2011). En el presente estudio, la preferencia de las células transferidas por los GL periféricos, es coincidente con el reclutamiento a GL de células CD11b⁺Ly6c⁺ como consecuencia de señales inflamatorias que ingresan desde la linfa. La quimiocina CCL2 producida en tejidos inflamados, es transportada rápidamente al endotelio de paredes altas de las vénulas postcapilares (HEV) para reclutar monocitos (Palframan y col., 2001),

que al ingresar a los GL, preservan su antiguo fenotipo durante un cierto período de tiempo (Yrlid y col., 2006).

Además de estudiar las variaciones fenotípicas, se utilizó la microscopía de tejido completo para evaluar la localización tisular de los MØs CD64+ del colon. En el estado estacionario, se observó una localización regular y homogénea que concuerda con la distribución reportada previamente con técnicas histológicas clásicas, a lo largo de todo el tracto, desde el intestino delgado proximal hasta el intestino grueso distal, con un enriquecimiento en la LP, cerca de la capa epitelial; esta posición significaría que son capaces de absorber y responder rápidamente a cualquier material que rompa esta barrera (Hume y col., 1984). En el contexto inflamatorio, se detectaron “clusters” de MØs CD64+CD11b+ o CD64+F4/80+, más desorganizados y en focos donde presumiblemente habría una mayor concentración de Ags luminales. Aunque no está bien establecido todavía, los MØs podrían regular la cicatrización de heridas directamente al interactuar con las células progenitoras epiteliales, una función previamente no reconocida para los MØs; esto se evaluó con el modelo de colitis DSS y se demostró que la respuesta regenerativa en áreas adyacentes a las brechas en la barrera epitelial depende de la microbiota intestinal y de la señalización mediada por Myd88; experimentos con ratones deficientes en MØs revelaron que la regeneración epitelial depende de estas células (Pull y col., 2005). Además, los MØs y las células dendríticas pueden tomar muestras de los componentes microbianos de la luz intestinal, proporcionando un vínculo clave entre la microbiota y las funciones de barrera epitelial, ya que además de reparar la barrera, el restablecimiento de la homeostasis requiere regular la activación del compartimento inmune adaptativo y los MØs residentes serían importantes en este proceso (Grainger y col., 2017).

Estos hallazgos en su conjunto dan cuenta de que la expresión de la molécula CD64 en los MØs intestinales está fuertemente influenciada por el

contexto y las señales que reciben las células. Esta idea se vió respaldada por los experimentos de marcación intracelular, donde tanto CD64 como IgG se encontraron prevalentemente en el interior de los MØs, observándose además diferencias en los patrones fluorescentes de controles y ratones DSS. Experimentos de hace varias décadas mostraron que, aún en ausencia de ligando unido, el FcγR se internaliza a la misma velocidad que muchas otras proteínas de la membrana celular, como parte del mecanismo de reciclado y desde los fagosomas puede volver a la superficie celular (Mellman y col., 1983; Steinman y col., 1983). Es más, la mayoría de las proteínas de membrana incluyendo los FcγR, evaden la degradación reciclando continuamente a la superficie celular después de su internalización (Kasuga y col., 1981). Evidencia más reciente utilizando otras metodologías ha confirmado y ampliado estos conceptos y actualmente se acepta que la internalización de los CIs por CD64 es un proceso de varios pasos: (i) la unión de IgG monomérica es capaz y suficiente para iniciar la rápida internalización de CD64 a un compartimento endosómico seguido de un rápido reciclaje a la superficie celular; (ii) el CD64 no ocupado no entra en esta vía de reciclaje de internalización; (iii) el entrecruzamiento del receptor ocupado provoca la retención del ligando dentro de la célula y la degradación posterior de los CIs, presumiblemente en un compartimento lisosómico; (iv) la acumulación intracelular de CD64-IgG se produce rápidamente después del entrecruzamiento a una velocidad de 20-30% por minuto y esencialmente se completa a los 5 min (Harrison y Allen, 1998; Akinrinmade y col., 2017). Efectivamente, una vez internalizado, el FcγR mantiene una vida media relativamente larga si se compara con otras proteínas de la superficie celular. Una situación completamente diferente ocurre cuando el receptor ha interaccionado con complejos de IgG multivalentes en donde la internalización se acompaña no sólo de la degradación intracelular del ligando, sino también de la disminución neta en la cantidad de receptores Fc de la

membrana plasmática (Ukkonen y col., 1986). Esto sugiere entonces que la IgG intracelular detectada como puntillado fino en MØs DSS correspondería a CIs multivalentes internalizados *in vivo* previos a su aislamiento. Reportes en la literatura han demostrado diferencias en la distribución en superficie y citoplasma del CD64, como por ejemplo en estudios de eliminación selectiva de MØs M1 *in vitro* utilizando toxinas acopladas a anticuerpos anti-CD64; esta selectividad se encontró vinculada a la reducida actividad de proteasas endosómicas en estas células que poseían por lo tanto menor internalización de CD64, siendo más sensibles al anticuerpo (Hristodorov y col., 2015). Las diferencias en la dinámica del reciclado del CD64 en MØs controles o inflamatorios se pudieron confirmar con los experimentos con Bafilomicina A1, un inhibidor específico de la enzima H⁺-ATPasa vacuolar (V-ATPasa) que promueve la acidificación de lisosomas, endosomas y vesículas secretoras, contribuyendo al tráfico vesicular/proteico y al reciclaje de receptores (Toei y col., 2010). En este caso, el incremento selectivo en la proporción de IgG intracelular en los MØs DSS tratados con Bafilomicina A1, pero no en controles, demostró que estas células experimentan diferencias en el reciclado de CD64. Por otra parte, la Bafilomicina A1 mostró efectos parcialmente inhibitorios sobre la internalización de *E. coli* opsonizada (mediada por FcγRs) por MØs alveolares, en concordancia con los resultados descriptos en este trabajo (Bidani y col., 2000).

La obtención de células de LP es dificultosa, requiere de una técnica laboriosa con varias horas de procesamiento, tratamiento del tejido con enzimas y tiene un rendimiento por lo general menor al deseado. Por estas razones, se plantearon experimentos con MØs derivados de MO como un modelo alternativo que pudiera reflejar el efecto de los CIs en MØs del tracto gastrointestinal. Si bien el marcador F4/80 no se vió modificado en la condición inflamatoria generada por el agregado de LPS, tanto CD11b como CD64 incrementaron su expresión, efecto

contrarrestado por el agregado de CIs OVA-IgG anti-OVA. Considerando que *ex vivo* se observó consistentemente una reducción del CD64 en MØs de LP de ratones con colitis mientras que *in vitro* la disminución estuvo asociada a la presencia de CIs, los resultados deberían analizarse con las siguientes consideraciones: (i) las células diferenciadas de MO luego de 7 días, son una población más homogénea en lo fenotípico y funcional, a diferencia de las de LP que son altamente heterogéneas, como se mencionó anteriormente; (ii) el agregado de LPS *in vitro* representa el primer estímulo inflamatorio para los MØs diferenciados de MO, en tanto que las células aisladas de la mucosa injuriada han estado expuestas a niveles muy abundantes de microorganismos y ligandos reconocidos por receptores de la inmunidad innata; (iii) los MØs diferenciados no han tenido contacto previo con CIs, mientras que durante la colitis DSS se detectan depósitos de CIs conteniendo IgG en la LP colónica de los ratones (Lin y col., 2019). En cuanto a la producción de mediadores, MØs F4/80+ CD14+CD64+ de ratones con colitis estimulados con IgG inmovilizada en placa o con IgG soluble, incrementaron la producción de IL-6, de manera similar a lo observado en este trabajo (Lin y col., 2019). Otros estudios con ratones sugieren que los CIs con IgG pueden inhibir la producción de IL-1 β y TNF- α por MØs diferenciados de MO si se estimulan con LPS, un fenómeno al menos parcialmente dependiente de la producción de prostaglandina E2 (Janczy y col., 2014). Para mimetizar lo que ocurre en el intestino, se realizaron ensayos con medios condicionados, en los que nuevamente se observó que el agregado de CIs produjo la disminución de la expresión de marcadores inflamatorios (CD64 y Ly6c) aún cuando al medio condicionado DSS se le agregó LPS. Estos resultados refuerzan la conclusión de que el receptor de alta afinidad de la porción Fc de la IgG es dinámico y que, es necesario evaluar su modulación en distintas condiciones para un mejor conocimiento de su comportamiento. En su conjunto, la disminución de la frecuencia y expresión del CD64 durante la colitis, el patrón de IgG intracelular en

MØs de LP y la inhibición del reciclaje sugieren que desde muy temprano en el contexto inflamatorio estaría ocurriendo una interacción con CIs que explicaría estos cambios, similares a los observados con el modelo *in vitro*. No obstante, revisiones muy recientes enfatizan que es necesario más trabajo para comprender si los MØs diferenciados *in vitro* reflejan con precisión la activación de los MØs tisulares por CIs *in vivo*, particularmente en el complejo ambiente del tracto gastrointestinal (Castro-Dopico y Clatworthy, 2019).

La aparición de mecanismos para regular las comunidades microbianas en el lumen y atenuar la ruptura de la barrera intestinal sería producto de la presión evolutiva, y los anticuerpos en general y la IgAs en particular, participarían de estas funciones (Hooper y Macpherson, 2010). Si bien se han estudiado extensamente las respuestas de anticuerpos a los patógenos, las relaciones de la IgAs con los comensales se han caracterizado mucho menos. Aunque el tracto gastrointestinal es un sistema tradicionalmente asociado con la IgA (Pabst, 2012), evidencias de los últimos años han llevado a una reevaluación del papel de la IgG y de los FcγRs en la inmunidad intestinal. Brevemente, se han detectado células B productoras de IgG2b e IgG3 en placas de Peyer y GLM de ratones adultos sanos (Koch y col., 2016), lo que es consistente con la descripción de células plasmáticas IgG1 + e IgG2 + en el intestino humano, específicas contra Ags microbianos (comensales y enteropatógenos) y autoantígenos (Benckert y col., 2011; Uo y col., 2013). Más aún, se ha postulado que estas respuestas de IgG exhiben una amplia reactividad microbiana y que se inducen directamente por señales de ligandos provenientes de comensales vía TLR en las células B, de manera independiente de las células T (Koch y col., 2016). Los experimentos en donde se evaluaron bacterias de MF recubiertas con IgA e IgG, aportaron información valiosa y novedosa ya que, si bien hay en la literatura trabajos donde se describen bacterias decoradas con IgA y se determina la composición mediante análisis de secuenciamiento (Palm y col.,

2014), no existen estudios que expliquen el significado de las bacterias de MF opsonizadas con ambas inmunoglobulinas, tanto en condiciones homeostáticas como en condiciones inflamatorias o que hayan evaluado exhaustivamente su efecto sobre los MØs de la LP. En base a la bibliografía existente, se podría hipotetizar que el papel de estas bacterias IgA+IgG+ sería distinto en el estado estacionario y la inflamación. Mediante un original y sofisticado modelo matemático que tiene en cuenta, velocidades de traslado de bacterias, espesor de la capa de mucus, tiempos y tasas de unión y desunión entre anticuerpo y bacterias y entre anticuerpos y mucinas, se ha caracterizado la interacción entre los dos anticuerpos más frecuentemente presentes en las mucosas en general, IgAs e IgG (Xu y col., 2019). El modelo predice que en condiciones fisiológicas la IgAs y la IgG tendrían un efecto sinérgico capaz de reforzar las propiedades de la barrera; la IgAs es el isotipo más potente para aglutinar patógenos en agregados grandes que no penetran a través del mucus, fenómeno conocido como exclusión inmune. Las bacterias nadan fácilmente a través del mucus y exponen abundantes Ags que favorecen la rápida acumulación de anticuerpos en su superficie. Esto genera suficientes enlaces cruzados entre los anticuerpos y la mucina que inmovilizan las bacterias en la capa mucosa más luminal, impidiendo la penetración y el flujo hacia el epitelio (Xu y col., 2019). El modelo prevé que, si las concentraciones de IgAs son elevadas, el anticuerpo que se acumula sobre la bacteria disminuye su velocidad y reduce la probabilidad de encontrar otra bacteria, con lo que la aglutinación no sería efectiva. En esta situación, la IgG unida a la bacteria, independientemente de si está aglutinada o no, establece múltiples enlaces débiles y transitorios con la mucina, un mecanismo que se conoce como “*muco-trapping*” y que facilitaría el anclaje y eliminación de las bacterias (Xu y col., 2019). En favor del modelo, se ha mostrado que la IgG específica contra Ags del virus de la influenza es capaz de inmovilizar potentemente los virus individuales en el mucus a través de múltiples

enlaces débiles y transitorios entre viriones-IgG y mucinas, similares a un parche de velcro (Wang y col., 2017). En la condición inflamatoria, la producción local de IgAs total se mantiene, aunque en los sitios de injuria se reduce el receptor de las inmunoglobulinas poliméricas y el componente secretorio, lo que resulta en defectos en la secreción de IgAs, menor capacidad de exclusión inmune y facilitación de la invasión bacteriana (Kleessen y col., 2002). Las bacterias que atraviesan el epitelio o lo invaden, inducirían o amplificarían respuestas de IgG preexistentes lo que se pone en evidencia en pacientes con EII, en los que se detecta una mayor actividad de IgG contra Ags microbianos en extractos de la mucosa que en muestras de suero (Folkersen y col., 1985). A lo largo de la colonización, la flora entérica induciría ondas de respuestas de IgAs autolimitadas en el tracto y esta exclusión inmune intermitente podría contribuir a la tolerancia parcial que aparentemente existe hacia las bacterias que residen en el intestino (Shroff y col., 1995). Esta tolerancia oral se anula claramente en la EII humana y en los modelos experimentales de inflamación intestinal en roedores y se traduce en un aumento *in vivo* en el recubrimiento de anticuerpos de bacterias lumbales (Brandtzaeg y col., 2005). La proporción de bacterias de MF viables y opsonizadas descrita en este Trabajo es ~30%; en controles sanos, aproximadamente el 36% de las bacterias anaerobias fecales está recubierto con IgA, el 12% con IgG y el 11% con IgM, en tanto que en pacientes con EII, estas cifras se elevan al 69%, 56% y 56%, respectivamente, sin diferencia entre colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn (van der Waaij y col., 2004). Utilizando citometría de flujo, se demostró que el 1,7 % de bacterias fecales de pacientes con enfermedad de Crohn está recubierta con IgG vs. un 1,3 % en controles y es independiente de la actividad de la enfermedad; además *E. coli* aislada de pacientes une más IgG que aquella aislada de voluntarios después de la adición de suero autólogo, lo que sugiere que el nivel de recubrimiento de IgG depende del tipo de bacteria y demuestra que en estos

pacientes hay una fuerte respuesta inmune específica contra sus propias bacterias *E. coli* (Harmsen y col., 2012). Otros autores han reportado la detección muy baja o nula de IgG específica para *E. coli* y *B. fragilis* en MF de pacientes control, mientras que pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa o gastroenteritis aguda presentan un incremento significativo de IgG específica para *E. coli* principalmente (Frehn y col., 2014). Las diferencias en las frecuencias reportadas en los estudios descriptos en este párrafo se deberían a las metodologías empleadas, a la falta de una técnica estandarizada y a variaciones esperables en individuos de distintas regiones del mundo.

En cuanto al origen de la IgG, provendría de la difusión desde el suero y de la producción local en la LP, ya que adyacente a las úlceras en la enfermedad de Crohn el número de células plasmáticas IgG+ aumenta 100 a 200 veces (Uo y col., 2013). Esto explica la mayor frecuencia de bacterias comensales IgG+ en las heces de pacientes con EI; no se sabe si la respuesta de IgG derivada del suero indica un historial de contacto con ciertas especies y se ha propuesto que puede haber una relación entre la cantidad de recubrimiento de IgG y la actividad de la enfermedad (van der Waaij y col., 2004). Es importante destacar que tanto los pacientes como los voluntarios tienen IgG en suero que puede unirse a Ags bacterianos, probablemente derivados de una exposición más temprana a estos Ags en un período en que la función de barrera se vió afectada. Es esperable entonces hallar bacterias IgG+ en individuos controles inmunocompetentes como observamos en este trabajo en ratones C57BL/6 WT controles. De manera interesante, los patrones de opsonización de bacterias se mantuvieron en los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Denning en Atlanta, validando los resultados obtenidos en el Departamento de Bioquímica Clínica - CIBICI, y confirmando la mayor liberación de inmunoglobulinas específicas contra bacterias de la flora intestinal (o potencialmente patógenas) al lumen en condiciones inflamatorias, de

manera rápida y aguda. La evaluación de LL control y DSS con bacterias comerciales confirmó que la composición de dichos líquidos varía según la condición inmunológica del colon, con mayor capacidad opsonizante evidenciada por una mayor IFM en la IgG e IgA anti-comensales en el líquido luminal DSS. En concordancia con el presente trabajo, se ha observado un aumento en las IgA e IgG solubles en heces de pacientes con EII activa, posiblemente porque los estímulos antigénicos asociados a la injuria resultan en un aumento de las células plasmáticas IgA+ e IgG+, seguido de una mayor secreción de IgA e IgG a la luz del intestino (Lin y col., 2018). El recubrimiento de microorganismos por anticuerpos podría promover la defensa contra la infección y regular la respuesta inmune hacia la microbiota para limitar las respuestas potencialmente dañinas, manteniendo así la homeostasis en comunidades microbianas (Simón Soro y col., 2015). El análisis de bacterias IgA+, IgG+ o IgA+IgG+ durante el curso de la colitis mostró que la proporción de bacterias IgA+ en MF se mantuvo constante hasta los días 6 y 7, momento crítico en cuanto a la sobrevida e inicio de la etapa de “recuperación” de los animales. Los modelos en los que la secreción de IgA disminuye, muestran una composición alterada de la microbiota, mayor susceptibilidad a la colitis y mayor translocación bacteriana a los GLM, pero es importante destacar que las perturbaciones se localizan más en el intestino delgado que en el grueso, posiblemente porque la IgAs interacciona predominantemente con las bacterias comensales del intestino delgado (Bunker y col., 2015). Además, la mayor fracción de bacterias IgA+ encontrada en el intestino delgado se correlaciona con títulos significativamente más altos de IgA libre en el lumen del intestino delgado. En condiciones homeostáticas hasta un 20% de las bacterias son IgA+ en las heces murinas de ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) y la opsonización está ausente en bacterias fecales de ratones que carecen de linfocitos T y B, lo que coincide con los resultados con ratones WT y μ MT. Que la fracción recubierta con IgA en intestino

grueso no sea mayor se debería a que los niveles de IgA libre son menores, las bacterias pueden escapar del recubrimiento por la variación de fase de los antígenos de polisacárido capsular superficial (Peterson y col., 2007) o bien la IgAs específica anti-comensal es limitante o puede ser degradada activamente por las proteasas bacterianas (Moon y col., 2015). Se observó además una disminución de la proporción de bacterias decoradas sólo con IgG en el día 4, el cual se corresponde en el protocolo de colitis con el “onset” de la enfermedad. Llamativamente, la proporción de bacterias opsonizadas con ambas inmunoglobulinas incrementó significativamente desde estadíos sumamente tempranos de la colitis (día 2), extendiéndose casi hasta el final del protocolo (día 6). Las alteraciones en la permeabilidad del intestino, el ingreso de bacterias y la expansión de clones productores de IgG determinarían que circule más IgG contra las bacterias intestinales en el torrente sanguíneo lo que, combinado con la mucosa intestinal ulcerada, permitiría filtrar más IgG a la luz del intestino (Harmsen y col., 2012). Es decir, con el progreso de la inflamación en el mismo huésped, la reducción de bacterias IgG+ se compensa con el aumento marcado de bacterias IgA+IgG+. Si bien el modelo matemático descrito anteriormente no toma en cuenta distintas alteraciones que se generan con la injuria, podría hipotetizarse que los efectos de la IgAs aglutinante facilitan la unión de la IgG en la colitis. El aumento en la proporción de bacterias IgA+IgG+ en MF es tan rápido y reproducible que podría representar un novedoso marcador temprano de EII. En este sentido se ha reportado un incremento en bacterias fecales recubiertas con IgA e IgG en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa activas, aunque no se pudo establecer la relevancia del hallazgo. Curiosamente los autores observaron que el porcentaje de bacterias recubiertas con IgA o IgG correlacionó fuertemente con los niveles de proteína C reactiva o la eritrosedimentación mientras el porcentaje de bacterias recubiertas con IgA/IgG mostró una correlación más débil (Lin y col.,

2018). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la flora fecal recubierta con IgA e IgG está presente en pacientes con EII y está asociada con la actividad de la enfermedad. En otro estudio, para las mismas muestras, los autores observaron que la suma de bacterias recubiertas con IgA e IgG fue mayor a 100%, concluyéndose que podría deberse a que una gran proporción de células están recubiertas por ambas inmunoglobulinas (Simón Soro y col., 2015). A pesar de estos escasos reportes, el significado del aumento de la doble opsonización con el curso de la inflamación no es claro y los efectos potencialmente sinérgicos de IgG e IgA anti-comensales en MØs CD64 de LP no han sido aún evaluados en profundidad. En este trabajo, se obtuvieron bacterias IgA+IgG+ (i) fijadas y sorteadas o (ii) viables y purificadas por columnas. Con respecto a la primera estrategia, otros autores han usado protocolos similares al aquí empleado, con fijación en paraformaldehído al 4% antes de la tinción y combinaron citometría de flujo y secuenciación “*next generation*” para identificar asociaciones huésped-microbios en muestras de saliva, heces, orina, mucosa, leche, etc. (Simón Soro y col., 2015). MØs de MO o extraídos de LP, luego de ser estimulados con bacterias IgA+IgG+ obtenidos según estrategia (i) mostraron niveles incrementados de nitritos lo que coincidió con un aumento en la producción de IL-10, demostrando activación de un perfil inflamatorio con producción de nitritos, pero a la vez altamente compensatorio. Las otras fracciones de bacterias purificadas (IgA+IgG- de animales control o DSS, IgA+IgG+ de animales control) no alcanzaron los niveles obtenidos con bacterias IgA+IgG+ de colitis, lo que sugiere que la combinación representa un estímulo más potente para los MØs, posiblemente porque IgG e IgA median funciones distintas y no redundantes, ya que no comparten el mismo patrón de unión a nivel molecular (Fadlallah y col., 2019). Resultados similares se han descrito con bacterias opsonizadas con IgA1 e IgA2 humanas (Sterlin y col., 2020). Los experimentos realizados con MØs de MO y bacterias viables (ii)

arrojaron resultados que siguen la misma línea: la fracción IgG+ de MF de ratones DSS sorteadas produjeron un incremento de TNF- α y de IL-10 respecto a la fracción IgG-. Estos resultados son similares a los obtenidos con M ϕ s estimulados con IgG inmovilizada en placa que liberan TNF- α e IL-6 (Lin y col., 2019). Si bien la IL-6 es considerada una citoquina pro-inflamatoria, podría tener efectos moduladores en los M ϕ s colónicos, hacia un fenotipo alternativo, de tipo M2 induciendo la expresión del receptor de IL-4. Trabajando con ratones que tienen el gen de una de las cadenas del receptor de IL-6 inactivado, se observó una mayor propensión a desarrollar inflamación inducida por obesidad y una respuesta exagerada a la endotoxemia inducida por LPS (Mauer y col., 2014). Estudios previos de nuestro grupo utilizando el modelo de colitis inducida por DSS en ratones IL-6 KO mostraron además mayor índice de la enfermedad respecto del grupo WT con colitis, indicando una respuesta inflamatoria mucho mas severa en ausencia de IL-6 (Pedrotti, 2013). Es decir que el incremento de esta citoquina en los cultivos de células estimulados con bacterias no necesariamente implica la potenciación de la respuesta inflamatoria ejercida por TNF- α , sino que podría estar favoreciendo el fenotipo tolerogénico en este modelo colaborando con la producción de IL-10.

Un fagocito generalmente no tarda más de unos minutos en engullir una partícula que no es demasiado grande y durante este tiempo, la célula exhibe una notable actividad que incluye reacciones de señalización, redistribución de moléculas y receptores y remodelación del citoesqueleto y la membrana celular (Freeman y Grinstein, 2014). Se cree que la fagocitosis por las células inmunes requiere eventos de adhesión y en ausencia de complemento, las células inmunes innatas se adhieren fácilmente a las superficies recubiertas con IgG. Además, para los distintos FcR, se ha demostrado que el número de copias de receptor en la superficie puede compensar una baja fuerza adhesiva al facilitar la formación de enlaces múltiples con anticuerpos inmovilizados (Heinrich, 2015). La internalización

a través de los receptores Fcγ implica varias etapas, comenzando con la agrupación de FcR que activan las vías de señalización para inducir el ensamblado de una estructura rica en actina que rodea la partícula y da lugar al fagosoma que se transporta al interior de la célula para su procesamiento y degradación (Barger y col., 2019). Para establecer los efectos de bacterias opsonizadas con IgA e IgG en la función de los MØs colónicos, se realizaron ensayos de fagocitosis con *E. coli pHrodo green*, biopartículas que solo fluorescen cuando se localizan en el ambiente ácido del fagolisosoma. Este ensayo permite cuantificar con precisión la fagocitosis por pequeñas poblaciones de MØs primarios, es altamente sensible, permite estudiar la modulación del proceso fagocítico y es inhibido por Bafilomicina A1 entre otros (Kapellos y col., 2016). Se detectó mayor capacidad fagocítica luego de la opsonización con LL tanto controles como DSS, de manera similar a lo reportado con MØs de MO y *E. coli pHrodo green* incubada con suero humano o IgG murina, lo que se interpreta como una mayor tasa de internalización de biopartículas (Kapellos y col., 2016). Notablemente, estos autores observaron además que MØs de MO polarizados a M1 (LPS+IFN-γ) mostraron menor actividad fagocítica que los polarizados a M2 (IL-4+IL-10), posiblemente porque la estimulación a través de TLR induce el estado de tolerancia a la endotoxina. Este fenómeno se observa cuando hay una repetida estimulación con LPS y podría ser una causa importante del deterioro de la capacidad fagocítica de poblaciones M1 *in vivo* (Collins y Carmody, 2015), lo que podría explicar que, excepto cuando fueron estudiados a tiempos cortos, los MØs colónicos de dadores control y DSS muestren tasas de fagocitosis semejantes. Las bacterias son partículas estructuralmente complejas cuya internalización por las células fagocíticas del huésped involucra múltiples receptores. Según los receptores específicos involucrados, la fagocitosis ocurre con distintos cambios en la membrana y el citoesqueleto, que incluyen desde la emisión de pseudópodos a la generación de invaginaciones (Underhill y Ozinsky,

2002). Los receptores Fc γ y Dectina-1 reconocen partículas opsonizadas con IgG y β -1,3-glucanos presentes en hongos, respectivamente. A pesar de detectar partículas opsonizadas vs. no opsonizadas, comparten un mecanismo de fagocitosis que implica la extensión de pseudopodios desde la membrana plasmática para engullir las partículas (Rougerie y col., 2013). Característicamente, las moléculas receptoras (FcR y Dectina-1) distribuidas sobre la superficie celular se reclutan rápidamente formándose oligómeros en el sitio de contacto de las partículas, aumentando la avidéz de la unión y permitiendo la inmovilización de la partícula para la internalización (Goodridge y col., 2012). El reclutamiento simultáneo de múltiples receptores proporciona una interacción de alta avidéz que supera la baja afinidad de los receptores individuales, y en este sentido, es importante destacar que la afinidad de la Dectina-1 por los β -glucanos es alta. Recientemente se ha demostrado que Dectina-1 expresado en la superficie de las células M es el receptor involucrado en la transcitosis inversa de CIs con IgAs tanto *in vitro* como *in vivo* (Rochereau y col., 2013). Además, se ha demostrado que células dendríticas aisladas de placas de Peyer y GLM interactúan con CIs conteniendo IgAs a través de los receptores Dectina-1 y SIGNR3, y luego de 90 min éstos se localizan en el citoplasma celular; los azúcares presentes en el componente secretorio serían críticos para esta interacción (Mikulic y col., 2017). Recientemente, se ha descrito que Dectina-1 también reconoce N-glicanos ricos en fucosa de la IgG y que esta interacción estimula la producción de superóxidos y citoquinas y la fagocitosis (Manabe y col., 2019). En base a estos hallazgos se ha propuesto que mientras los CIs basados en IgG estimulan múltiples funciones del huésped a través de FcRs, los CIs de IgAs proporcionarían más bien un interruptor regulador funcional capaz de desconectar procesos inflamatorios que ya no son requeridos a través de la interacción con los receptores SIGNR3 y Dectina-1 (Bournazos y col., 2015; Mikulic y col., 2017).

Conclusión

En conclusión, este trabajo de Tesis contribuye al conocimiento de la función del marcador CD64 en MØs de LP colónica mostrando que es un receptor funcional tanto en condiciones homeostáticas como en un contexto inflamatorio, capaz de modularse según los requerimientos inmunológicos del tejido, favoreciendo la endocitosis rápida del agregado receptor-CI e incrementando la velocidad de dicho proceso cuando la circunstancia lo requiere. Uno de los grandes aportes de este trabajo es remarcar la plasticidad de los MØs colónicos frente al estímulo con CIs presentes en la luz intestinal, bacterias recubiertas con inmunoglobulinas, de la siguiente manera: (i) modulando la intensidad de expresión del FcγRI según el origen de las bacterias y los anticuerpos que las recubren, (ii) liberando el acervo adecuado de citoquinas inflamatorias mientras compensan los efectos perjudiciales con la producción de grandes cantidades de IL-10, y (iii) fagocitando dichos CIs de manera rápida y eficaz principalmente en condiciones inflamatorias en donde la frecuencia de bacterias recubiertas con IgA+IgG aumenta considerablemente en los modelos utilizados. Por otra parte, en cuanto a la clasificación previamente descrita, podría decirse que estos MØs tanto en condiciones homeostáticas como inflamatorias tenderían hacia un fenotipo más similar al espectro M2, conjugando la liberación de citoquinas inflamatorias con un componente altamente compensatorio, con una expresión de CD64 que se reduce en el modelo de colitis por DSS debido a la tasa de recambio más rápida en este escenario, con una alta capacidad fagocítica y baja expresión de Ly6c, lo cual los ubica dentro de la población de MØs restauradores descritos previamente (Tacke y Zimmermann, 2014). Este fenotipo además se ve favorecido por la presencia de IL-6, y les permitiría interactuar con las células progenitoras epiteliales, favoreciendo la regeneración del tejido, proceso claramente exacerbado en un ambiente adverso, con mediadores inflamatorios, injuria del tejido e ingreso masivo de bacterias y ligandos que promueven la activación de diversas células efectoras. Finalmente,

debido a la heterogeneidad de las poblaciones de MØs, las especies bacterianas y a la composición del LL, es necesario evaluar el comportamiento de dichas células en cada modelo en particular para un conocimiento más preciso y completo de la respuesta que desencadenaría un potencial estímulo inflamatorio.

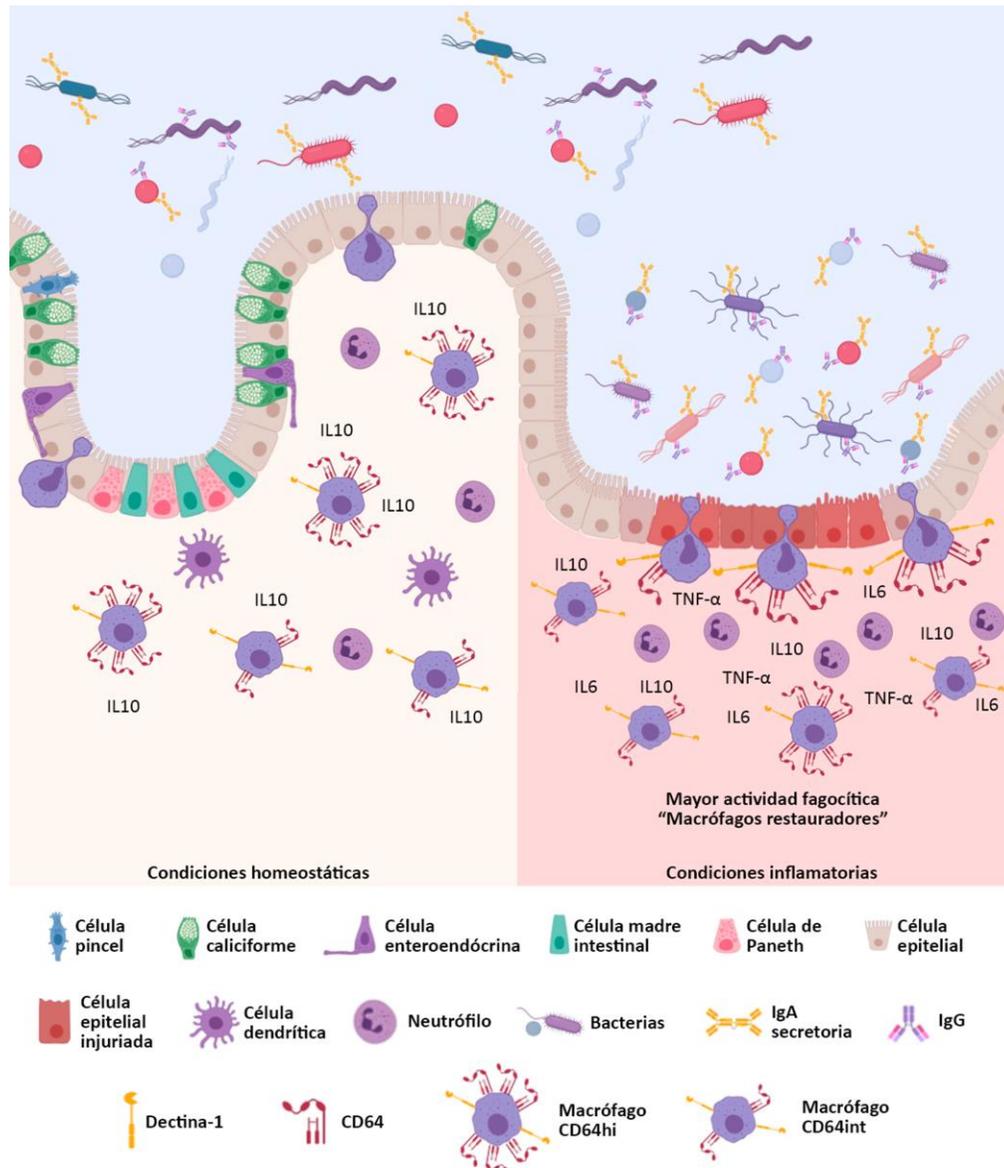


Figura 39. Resumen gráfico. En condiciones homeostáticas, la lámina propia intestinal presenta gran cantidad de células F4/80+ que expresan CD64, se distribuyen de manera homogénea y liberan citoquinas regulatorias como IL-10. La presencia de bacterias doble positivas es escasa, y la barrera de mucus y la capa de epitelio intactos permiten la exclusión inmune (izquierda). En condiciones inflamatorias, se incrementan tempranamente los niveles de IgG en el lumen y la pérdida de integridad del epitelio y la discontinuidad en el mucus permiten la invasión de la mucosa por parte de bacterias doble positivas. En los focos de injuria tisular se concentran macrófagos F4/80+CD64+ que presentan un fenotipo restaurador, con mayor actividad fagocítica y, al ser estimulados, liberan citoquinas como IL-6 y TNF-α (derecha).

Reactivos y anticuerpos

LPS de *E. coli* O55-B5, ovoalbúmina tipo V, Reactivo de Griess modificado, Ficoll-Hypaque y anticuerpo anti-IgA (α -chain specific) fueron de la firma Sigma-Aldrich Co. Colagenasa D de *Clostridium histolyticum* fue de la firma Roche. Molecular probes, de Invitrogen proveyó los reactivos pHrodo Green *E. coli* (bacterias marcadas con una sonda que en contacto con pH ácido emite a 533 nm, número de catálogo P35366) y SytoBC (mezcla de colorantes que une ácidos nucleicos de bacterias y emite a 500 nm, número de catálogo S34855), ambos observados en el canal de fluorescencia verde en el citómetro. DSS fue donado por Dextran Products Limited (Scarborough, Ontario, Canadá, M1L 2H5), mientras que el suero policlonal de conejo anti-OVA fue producido por Natocor (Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Las perlas magnéticas (anti-APC MicroBeads) y las columnas de separación magnética (LS Cell Separation Columns) se obtuvieron de Miltenyi Biotec. Los medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM fueron comprados a la firma Gibco, Thermo Fisher Scientific.

Los anticuerpos anti-CD11b (M1/70), anti-MHC-II (IA-IE, M5/114.15.2), anti-Ly6c (AL-21), anti-CD64 (X54-5/7.1, PE) fueron de la firma BD PharMingen (San Diego, CA, EEUU). Los anticuerpos anti-F4/80 (BM8), anti-CD45.1 (A20), anti-IgG (poly4053) y anti-CD64 (X54-5/7.1, PerCP-Cy5.5) fueron de la firma BioLegend (San Diego, CA, EEUU). El anticuepo anti-Ep-Cam (68.8) fue de la firma eBioscience (Santa Clara, CA, EEUU); el anticuerpo anti-CD64 no conjugado (policlonal) fue de R&D Systems.. Algunos de estos anticuerpos estaban conjugados a distintos fluorocromos como isotiociano de fluoresceína (FITC), alofocianina (APC), ficoeritrina (PE), peridinin-clorofil-proteína (PerCP) y sus derivados APC-Cy7, PE-Cy5, PE-Cy7, y PerCP-Cy5.5. El anticuerpo anti-CD16/CD32 (2.4G2, Fc block) fue adquirido a la firma Bio X Cell (West Lebanon, NH, EEUU).

Animales

En el presente trabajo, se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 (WT) CD45.1 o CD45.2 y de las cepas Dectina-1 KO (B6.129S6-Clec7a^{tm1Gdb}/J, o B6.clec7a^{-/-}) o μ MT (B6.129S2-Ighm^{tm1Cgn}/J, o B6.muMt⁻) con el mismo “background” genético, machos y hembras de 8-10 semanas de edad, con un peso aproximado de 25 gramos, criados en condiciones libres de patógenos específicos y mantenidos bajo condiciones estándares de temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad 12:12 en el bioterio del CIBICI (CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Los protocolos de experimentación fueron aprobados por la Comisión de Evaluación de Protocolos con Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC (Resolución HCD 1696/2016 “Macrófagos CD64+ IgG y pentraxinas en la homeostasis intestinal”).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la medias \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre grupos se determinaron mediante ANAVA de una o dos vías, seguido de un post-hoc de Bonferroni o LSD de Fischer cuando el n por grupo fue distinto. Los análisis estadísticos convencionales se realizaron mediante el software Infostat (Infostat versión 2016, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los valores de significancias correspondientes a $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Citoextendidos

Células extraídas de LP como se indica en el apartado “Obtención de células de órganos linfoides” \rightarrow “Lámina propia” se trataron con Ac anti F4/80 conjugado a alofocianina, se fijaron y permeabilizaron y se incubaron con un Ac anti IgG

conjugado a fluoroisotiocianato. Se tomaron 100 uL de una suspensión de dichas células a una concentración de 5×10^5 células/mL, y se centrifugaron en una citocentrífuga (Shandon Elliott) durante 5 min a 2000 rpm para obtener los citoextendidos sobre portaobjetos comunes (B&C, Alemania). Posteriormente se observaron las células en un microscopio de epifluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática y platina motorizada.

Citometría de Flujo

El estudio de la expresión de marcadores de superficie se realizó con los protocolos establecidos anteriormente en este grupo de trabajo (Pedrotti y col., 2016; Barrios y col., 2019). Brevemente, se tomaron 1×10^6 células de la suspensión de GLM, GLI o células de LP y se procedió a la marcación durante 30 min a 4°C con anticuerpos monoclonales específicos conjugados a distintos fluorocromos detallados en el apartado Reactivos y Anticuerpos. En algunos casos se realizó citometría intracelular de CD64, IgG o citoquinas, utilizando el kit para citometría intracelular CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences). Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas en tampón FACS previo a su análisis mediante el citómetro FACS Canto II, FACS LSR Fortessa (BD Biosciences) o Attune NxT (Life Technologies). Los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

Evaluación de Igs unidas a bacterias de materia fecal o mucus

Para MF: se recogieron 2 bolos de tamaño similar por individuo, de animales control, DSS o μ MT en 1 mL de PBS, y se deshicieron con ayuda de pinzas.

Para mucus: Se tomó el colon de animales controles o colitis, se removió la MF con PBS, y se abrieron longitudinalmente. Con ayuda de un bisturí se raspó cuidadosamente el interior evitando arrastrar tejido, y se colocó la muestra de mucus en 1 mL de PBS.

A continuación, las muestras de MF o mucus se agitaron con vórtex por 30 seg. Se centrifugó por 5 min a 1500 rpm para separar desechos grandes. Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se lavaron en 1 mL de PBS por 10 min a 8000 x *g* para separar inmunoglobulinas no unidas a bacterias. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ L de solución 1/100 en PBS de anticuerpos anti-IgG conjugados a ficoeritrina (Biolegend) y anti-IgA conjugados a fluoroisotiocianato (Sigma) por 30 min a 4°C. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Experimentos con *E. coli* Dh5-alpha

Se tomaron partes iguales de una suspensión de bacterias *E. coli* Dh5-alpha y de LL de ratones control o con colitis obtenidos como se explica en el apartado “Inducción de condición inflamatoria”, y se incubaron por 30 min a 37°C. A continuación, las muestras se lavaron en 1 mL de PBS por 10 min a 8000 x *g* para separar inmunoglobulinas no unidas a bacterias. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ L de solución 1/100 en PBS de anticuerpos anti-IgG conjugados a ficoeritrina (Biolegend) y anti-IgA conjugados a fluoroisotiocianato (Sigma) por 30 min a 4°C. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Fagocitosis de bacterias (Phrodo Green, pHg) recubiertas con Igs

Se sortearon MØs de LP de ratones C57BL/6 WT controles o luego del protocolo de colitis inducida por DSS, como se describió en el apartado “Inducción de condición inflamatoria”, y se estimularon con el reactivo comercial *E. coli* pHrodo Green, una bacteria inactivada marcada con una sonda que fluoresce cuando se encuentra a pH ácido, y por lo tanto, permite evaluar la fagocitosis por parte de las células de interés mediante citometría de flujo. Bacterias *E. coli* pHrodo Green solas ó previamente incubadas por 30 min a 37°C con LL de ratones control o con colitis se cultivaron con los MØs por 30, 60 ó 90 min a 37°C (tubos representativos

incubados a 4°C se usaron como control negativo de fagocitosis). Posteriormente se prepararon las células para análisis por citometría de flujo.

Fagocitosis de complejos inmunes de proteínas solubles

Se cultivaron MØs derivados de MO o sorteados de LP con diferentes concentraciones de CIs OVA-FITC-IgG anti-OVA a diferentes tiempos: 15, 30, 60 y 90 min, a 37°C. Como control los MØs se incubaron con OVA-FITC y una inmunoglobulina de isotipo IgG no específica para OVA. Para discriminar la fluorescencia total de la intracelular (CIs fagocitados por las células), cada condición se procesó por duplicado y en uno de ellos se agregó Azul de Tripán (AT) previo al análisis por citometría de flujo, para desactivar o extinguir la fluorescencia extracelular (Santos y col., 2015).

Inducción de condición inflamatoria (colitis inducida por DSS)

Se utilizó el protocolo establecidos anteriormente en el grupo de trabajo (Sena y col., 2015; Pedrotti y col., 2016). Se administró DSS al 3% en el agua de beber de los ratones durante 5 días, y los últimos 2 días del protocolo se mantuvo a los animales con agua estéril, permitiendo su recuperación. Se registró el peso, consistencia de heces y presencia de sangre oculta en MF durante todos los días que duró el tratamiento, y se procedió al sacrificio mediante dislocación cervical en el día 7.

Inmunofluorescencia de tejido entero (whole mount immunofluorescence)

Se extrajo el colon de animales C57BL/6 controles o luego del protocolo de colitis inducida por DSS, se limpió exhaustivamente con PBS, y se cortó longitudinalmente. Luego de un nuevo lavado con PBS, se cortaron trozos de 0,5 cm. Se tiñeron con anti-CD64, anti-Ep-Cam, anti-CD11b o anti-F4/80 y DAPI en 500

μL de PBS con 5% de suero fetal bovino (SBF) y Tween 20 (12,75 μL cada 25 mL). Se incubó por 8-12 hs en agitación a 4°C. Se realizaron 4 lavados de 15 min con PBS 5% SBF en agitación a 4°C, y se fijó con PBS 2% de p-formaldehído por 2 hs. Se realizaron 4 lavados de 15 min con PBS 5% SBF en agitación a 4°C y se montaron los tejidos en porta objetos con Fluor Save (Merck Millipore) o Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich). Las muestras se observaron en microscopio confocal Olympus FV 1200 a 40x (Khanna y col., 2007).

Marcación de ovoalbúmina (OVA) con isotiocinato de fluoresceína (FITC)

Se disolvió OVA en agua destilada 18X en concentración 1 mg/mL. Se tomaron 500 μL de esta solución y se mezclaron con 1 mL de tampón carbonato de pH 9. Se disolvió FITC en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y se agregaron 50 μL a la solución anterior. Se cubrió el tubo con papel aluminio y se incubó por 90 min a 37°C. Se obtuvo la proteína marcada por filtración a través de columnas PD-10 (GE Healthcare) con tampón PBS.

Métodos colorimétricos para detección de mediadores solubles

Las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- α se determinaron a través de ensayos de enzimoimmunoanálisis (ELISA) utilizando los kits de BD Biosciences según las instrucciones del proveedor.

Para nitritos/óxido nítrico presentes en sobrenadantes de cultivo se utilizó Reactivo de Griess comercial (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del proveedor.

Obtención de células de médula ósea

Se utilizó un protocolo descrito previamente (Weischenfeldt y col., 2008); brevemente, se obtuvieron el fémur y la tibia de ambas extremidades de animales C57BL/6 CD45.1 o CD45.2. A continuación se enjuagó con 2 mL de PBS por

extremidad, con agujas 28-G y jeringas de 10 mL, hasta quedar semi-translúcidos. Se filtró la suspensión resultante a través de filtro de 40 μm , y se centrifugó 10 min a 2500 rpm a temperatura ambiente. Se resuspendió en 2 mL de medio RPMI suplementado con SFB al 10%, glutamina al 1% y antibióticos al 0,1%. Se contabilizó la suspensión celular obtenida con Líquido de Turk (ácido acético al 3% y violeta de genciana).

Obtención de células de órganos linfoides

- **Ganglios linfáticos mesentéricos y Ganglios linfáticos inguinales**

Se extrajeron los GLM de la cavidad peritoneal y los GLI de los pliegues de los flancos laterales, excluyendo el tejido adiposo y la red de vasos linfáticos. Por disgregado mecánico se obtuvieron las suspensiones celulares correspondientes.

- **Lámina Propia**

El aislamiento de células de LP de colon se realizó siguiendo protocolos descritos en el grupo de trabajo (Sena y col., 2015; Pedrotti y col., 2016) con algunas modificaciones como se detalla a continuación: se removió el colon de la cavidad abdominal y se removió cuidadosamente la MF, la materia grasa y los vasos sanguíneos. Se lavó con PBS-gentamicina (0,1%), se abrió longitudinalmente y se cortó en trozos de 0,5 cm aproximadamente. Posteriormente, se incubó en PBS suplementado con SBF al 10%, glutamina al 1%, gentamicina y antifúngicos al 0,1% y 1 mM de DTT (DL-dithiothreitol, D0632 Sigma Aldrich) durante 15 min a temperatura ambiente en agitación a 120 rpm, para remover las células del epitelio. Luego, se realizó un lavado con PBS (gentamicina 0,1%) y dos incubaciones de 30 min a 37°C en agitación a 120 rpm en tampón PBS suplementado con SBF al 10%, glutamina al 1%, gentamicina y antifúngicos al 0,1% y EDTA 1 mM, descartando en cada caso el sobrenadante. Terminada esta etapa, tras un nuevo

lavado con PBS (gentamicina 0,1%) se realizaron 3 incubaciones de 45 min a 37°C en agitación a 120 rpm en medio RPMI completo con colagenasa tipo IV (5 µg/mL), para desarmar las fibras de colágeno y permitir la liberación de las células de LP. Al finalizar cada una de ellas se colectó el sobrenadante que se mantuvo en hielo. El tejido remanente se disgregó mecánicamente con malla metálica, se lavó con RPMI, se adicionó al sobrenadante mantenido en hielo y se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el “*pellet*” se resuspendió en medio RPMI completo.

Obtención de líquidos luminales

Se tomó el colon de animales controles o luego del protocolo de colitis inducida por DSS y se removió cuidadosamente la MF. El intestino se enjuagó con 1 mL de PBS, colectando el líquido en tubos eppendorf. Se centrifugó por 10 min a 8000 x g, y se pasó el sobrenadante por filtros de 0,2 µm para eliminar las bacterias presentes en el lumen (Zeng y col., 2016). Para los experimentos de capacidad opsonizante de estos líquidos los usó sin diluir, y diluidos 1/10 y 1/100 vol de LL en vol de PBS).

Obtención de MØs

Modelo “ex vivo”: se extrajo el colon completo (peso aproximado 180 mg) de ratones de la cepa C57BL/6 WT, controles o sometidos a un protocolo de colitis inducida por DSS (ratones DSS) y se obtuvo una suspensión de células de LP luego de la digestión enzimática con Colagenasa tipo IV como se describe en el apartado “Obtención de células de órganos linfoides” → “Lámina propia”. En algunos experimentos la suspensión obtenida previamente se procesó a través de citometría de flujo, purificándose MØs F4/80+ de LP.

Modelo "in vitro - Diferenciación de MØs derivados de MO: Se obtuvieron células de MO de ratones C57BL/6 CD45.2 como se describe en el apartado "Obtención de células de médula ósea", y de la suspensión resultante se sembró el mismo número de leucocitos (1×10^6 /mL) en placas de 24 o 48 pocillos. Se llevaron al mismo volumen final (1 mL o 0,5 mL, respectivamente) con medio RPMI suplementado con SFB al 10%, glutamina al 1%, antibióticos al 0,1% y sobrenadante de la línea celular de fibroblastos L-929 al 15%. Al tercer día de la siembra se agregó medio fresco y se controló la diferenciación de los MØs a través de la observación del cambio de morfología (de forma circular a forma ahusada) y la adherencia a la placa por microscopía óptica cómo se ha descrito previamente (Weischenfeldt y col., 2008). Al sexto día se descartó el sobrenadante y se colocaron los estímulos preparados en medio fresco o medio condicionado según el diseño experimental. Los sobrenadantes se recogieron 24 o 48 hs post cultivo y se utilizaron para determinar citoquinas. Las células se cosecharon con solución de 1mM EDTA y se procedió a la marcación durante 30 min a 4°C con anticuerpos monoclonales específicos conjugados a distintos fluorocromos.

Obtención de sobrenadante de línea celular de fibroblastos L-929

En un frasco plástico de 200 mL se sembraron 50.000 células de la línea L-929, que secreta un factor de diferenciación macrofágico, en 50 mL de medio DMEM suplementado con 10% SBF, 1% de glutamina y 0,1% de gentamicina. Se recogió el sobrenadante cada 2 días, reemplazándolo con medio fresco, se centrifugó por 10 min a 2500 rpm y se filtró a través de filtros de 40 µm (Weischenfeldt y col., 2008).

Preparación de complejos inmunes de proteínas solubles

Se incubó OVA en las siguientes concentraciones: 1,6 µg/mL, 8 µg/mL y 16 µg/mL con diluciones en RPMI 1/75 (correspondiente a C11), 1/15 (correspondiente

a CI2) y 1/7,5 respectivamente, de antisuero de conejo específico contra OVA (Natocor), por 30 min a 37°C como ha sido descrito por Castell y col., 2019.

Preparación de medios condicionados a partir de cultivos de explantos de intestino grueso

Intestinos gruesos completos de animales control o luego del protocolo de colitis inducida por DSS fueron abiertos longitudinalmente y lavados con PBS suplementado con antibióticos al 0,1%. Se cultivaron durante 24 hs en 1 mL de medio RPMI suplementado con 10% de SBF, glutamina al 1% y antibióticos al 0,1% y posteriormente se recogieron los sobrenadantes, los cuales se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm y fueron utilizados como medios condicionados control y colitis (Sena y col., 2015).

Purificación de bacterias fijadas recubiertas con Igs mediante citometría de flujo

Se obtuvieron bacterias de MF de animales controles o sometidos a protocolo de colitis como se describió anteriormente, con ligeras modificaciones, como sigue: luego de centrifugar a $8000 \times g$ el *pellet* se resuspendió en 500 μ L de solución 1/100 en PBS de anticuerpos anti-IgG conjugados a ficoeritrina (Biolegend) y anti-IgA conjugados a fluoroisotiocianato (Sigma) por 30 min a 4°C. Finalmente, las muestras se fijaron por 15 min con PBS 2% de p-formaldehído. Las bacterias fijadas IgG+, IgA+ o IgG+IgA+ (dobles positivas, DP) se obtuvieron mediante un Cell Sorter FACS Aria II (BD Biosciences).

Purificación de bacterias viables recubiertas con Igs mediante Perlas Magnéticas

Se obtuvieron bacterias de MF de animales controles o luego del protocolo de colitis inducida por DSS, como se describió en el apartado “Purificación de bacterias fijadas recubiertas con Igs mediante citometría de flujo” con ligeras modificaciones, como sigue: luego de centrifugar a $8000 \times g$ el “*pellet*” se resuspendió en 500 μL de anti-IgG asociado a APC 1/100 en PBS por 30 min a 4°C . Luego de un lavado con PBS, se resuspendió el *pellet* en 200 μL y se agregaron 50 μL de perlas magnéticas asociadas a un anticuerpo anti-APC (anti-APC MicroBeads, Miltenyi), y se incubaron por 15 min en hielo. Las muestras se eluyeron a través de Columnas MACS LS colocadas en un campo magnético MACS (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del proveedor. Se analizó la pureza por citometría de flujo.

Purificación de MØs de LP utilizando citometría de flujo

Para aislar MØs de LP, luego de la digestión enzimática de células de LP de colon descrita en el apartado “Obtención de células de órganos linfoides” → “Lámina propia”, se procedió a la tinción con el anticuerpo anti-F4/80 y la sonda de viabilidad durante 30 min a 4°C . Luego de la tinción, se agregó PBS a la suspensión de células y se centrifugó por 5 min a 1500 rpm. Se resuspendió el sedimento en 2 mL de medio RPMI completo. Las células vivas F4/80+ se obtuvieron a través de un Cell Sorter FACS Aria II (BD Biosciences).

Transferencia adoptiva de células inmaduras de médula ósea (MO)

Se obtuvieron células de MO de ratones C57BL/6 CD45.1 como se detalló en el apartado “Obtención de células de médula ósea”, y la suspensión resultante se centrifugó en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Luego de esta etapa, las células obtenidas fueron teñidas con el compuesto fluorescente éster de

succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) por 10 min a 37°C y se inyectaron 10-20 millones de células en receptores C57BL/6 CD45.2 control o con protocolo de colitis al día 5. Finalmente, al día 7 se obtuvieron células de GLM, GLI y LP que se evaluaron por citometría de flujo.

Bibliografía

Akinrinmade OA y col., 2017. CD64: An Attractive Immunotherapeutic Target for M1-type Macrophage Mediated Chronic Inflammatory Diseases. *Biomedicines* 5(3). pii: E56. doi: 10.3390/biomedicines5030056.

Bäckhed F, 2011. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann Nutr Metab* 58 Suppl 2:44-52. doi: 10.1159/000328042.

Bain CC y col., 2013. Resident and Pro-Inflammatory Macrophages in the Colon Represent Alternative Context-Dependent Fates of the Same Ly6C^{hi} Monocyte Precursors. *Mucosal Immunol* 6 (3), 498-510. doi: 10.1038/mi.2012.89.

Bain CC y col., 2014. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15(10):929-937. doi: 10.1038/ni.2967.

Barger SR y col., 2019. Membrane-cytoskeletal Crosstalk Mediated by myosin-I Regulates Adhesion Turnover During Phagocytosis. *Nat Commun* 10(1):1249. doi: 10.1038/s41467-019-09104-1.

Barnes N y col., 2002. FcγRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity* 16: 379-389. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00287-x.

Barrios BE y col., 2019. A selective window after the food-intake period favors tolerance induction in mesenteric lymph nodes. *Mucosal Immunology* 12 (1), 108-116. doi: 10.1038/s41385-018-0095-3.

Batty I y Bullen JJ, 1961. The permeability of the sheep and rabbit intestinal wall to antitoxin present in the circulation. *J Pathol Bacteriol* 81:447-58. doi: 10.1002/path.1700810218

Benckert J y col., 2011. The majority of intestinal IgA + and IgG + plasmablasts in the human gut are antigen-specific. *J Clin Invest* 121:1946–55. doi: 10.1172/JCI44447.

Bidani A y col., 2000. Bactericidal activity of alveolar macrophages is suppressed by V-ATPase inhibition. *Lung* 178(2):91-104. doi: 10.1007/s004080000012.

Bournazos S y col., 2015. The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *J Exp Med* 212(9):1361-9. doi: 10.1084/jem.20151267.

Brandtzaeg P y col., 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 206:32–63. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x.

Bruhns P y Jönsson F., 2015. Mouse and Human FcR Effector Functions. *Immunol Rev* 268 (1), 25-51. doi: 10.1111/imr.12350.

Bunker JJ y col., 2015. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* 43(3):541-53. doi: 10.1016/j.immuni.2015.08.007.

Castell SD y col., 2019. Neutrophils Which Migrate to Lymph Nodes Modulate CD4+ T Cell Response by a PD-L1 Dependent Mechanism. *Front Immunol* 10:105. doi: 10.3389/fimmu.2019.00105.

Castro-Dopico T y Clatworthy MR, 2019. IgG and Fcγ Receptors in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front Immunol* 10:805. doi: 10.3389/fimmu.2019.00805.

Castro-Dopico T y col., 2019. Anti-commensal IgG Drives Intestinal Inflammation and Type 17 Immunity in Ulcerative Colitis. *Immunity*. 50(4):1099-1114.e10. doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.006.

Cerutti A y Rescigno M, 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28(6):740-50. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001.

Cid J y col., 2010. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* 60:313–319. doi: 10.1016/j.jinf.2010.02.013.

Collins PE y Carmody RJ, 2015. The regulation of endotoxin tolerance and its impact on macrophage activation. *Crit Rev Immunol* 35 (4) 293–323. doi: 10.1615/critrevimmunol.2015015495.

Davidson NJ y col., 1998. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 15;161(6):3143-9.

De Calisto J y col., 2012. FcγRI (CD64): an identity card for intestinal macrophages. *Eur J Immunol* 42(12):3136-40. doi: 10.1002/eji.201243061.

Dieterich W y col., 2018. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci (Basel)*. 6(4). pii: E116. doi: 10.3390/medsci6040116.

Dos Anjos Cassado A y col., 2017. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ* 62:161-179. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_7.

El Aidy S y col., 2013. The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes* 4(2):118-24. doi: 10.4161/gmic.23362.

Fadlallah J y col., 2019. Synergistic convergence of microbiota-specific systemic IgG and secretory IgA. *J Allergy Clin Immunol* 143 (4), 1575-1585.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2018.09.036.

Fagarasan S y col., 2010. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol* 28:243-73. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101314.

Fernando MR y col., 2014. The Pro-Inflammatory Cytokine, interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *PLoS One* 9 (4), e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188.

Folkersen J y col., 1985. Application of electroblotting technique to studies of the intestinal antibody response to extractable fecal antigens. *Scand J Gastroenterol* 20:247-253. doi: 10.3109/00365528509089666.

Freeman SA y Grinstein S, 2014. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 262 pp. 193-215. doi: 10.1111/imr.12212.

Frehn L y col., 2014. Distinct Patterns of IgG and IgA against Food and Microbial Antigens in Serum and Feces of Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *PLoS One* 9 (9), e106750. doi: 10.1371/journal.pone.0106750.

Gallo P y col., 2010. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett* 133(2):70-7. doi: 10.1016/j.imlet.2010.07.004.

Garrett WS y col., 2010. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell* 140 (6), 859-70. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.023.

Gauglitz GG y col., 2008. Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock* 30(5):503-7. doi: 10.1097/SHK.0b013e31816e3373.

Gensollen T y col., 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 29;352(6285):539-44. doi: 10.1126/science.aad9378.

Ghosh S y col., 2012. μ -chain-deficient mice possess B-1 cells and produce IgG and IgE, but not IgA, following systemic sensitization and inhalational challenge in a fungal asthma model. *J Immunol*. 189(3):1322-9. doi: 10.4049/jimmunol.1200138.

Gómez de Agüero M y col., 2016. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science*. 351(6279):1296-302. doi: 10.1126/science.aad2571.

Goodridge HS y col., 2012. Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic* 13(8):1062-71. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01382.x.

Gordon S y col., 1992. Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 181:1–37. doi: 10.1007/978-3-642-77377-8_1.

Grainger JR y col., 2017. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflugers Arch* 469(3): 527–539. doi: 10.1007/s00424-017-1958-2.

Hadis U y col., 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34(2):237-46. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.016.

Harrison PT y Allen JM, 1998. High affinity IgG binding by FcγRI (CD64) is modulated by two distinct IgSF domains and the transmembrane domain of the receptor. *Protein Eng* 11(3):225-32. doi: 10.1093/protein/11.3.225.

Harmsen HJ y col., 2012. Crohn's disease patients have more IgG-binding fecal bacteria than controls. *Clin Vaccine Immunol* 19(4):515-21. doi: 10.1128/CVI.05517-11.

Heinrich V, 2015. Controlled One-on-One Encounters between Immune Cells and Microbes Reveal Mechanisms of Phagocytosis. *Biophys J* 4;109(3):469-76. doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.042.

Hooper LV y Macpherson AJ, 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 10, 159–169. doi: 10.1038/nri2710.

Hristodorov D y col., 2015. Targeting CD64 mediates elimination of M1 but not M2 macrophages in vitro and in cutaneous inflammation in mice and patient biopsies. *MAbs* 7(5):853-62. doi: 10.1080/19420862.2015.1066950.

Hulett MD y Hogarth PM, 1998. The Second and Third Extracellular Domains of FcγRI (CD64) Confer the Unique High Affinity Binding of IgG2a. *Mol Immunol* 35 (14-15), 989-96. doi: 10.1016/s0161-5890(98)00069-8.

Hume DA y col., 1984. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia. *Anat Rec* 210(3):503-12. doi: 10.1002/ar.1092100311

Ingersoll MA y col., 2011. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 32(10): 470–477. doi: 10.1016/j.it.2011.05.001.

Italiani P y Boraschi D, 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5, 514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.

Jakobsson HE y col., 2015. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* 16(2):164-77. doi: 10.15252/embr.201439263.

Jakubzick C y col., 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39:599–610. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007.

Janczy JR y col., 2014. Immune complexes inhibit IL-1 secretion and inflammasome activation. *J Immunol* 193:5190–8. doi: 10.4049/jimmunol.1400628.

Jaumouillé V y Grinstein S, 2011. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 23(1):22-9. doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.006.

Johansson ME y Hansson GC, 2013. Mucus and the goblet cell. *Dig Dis* 31(3-4):305-9. doi: 10.1159/000354683.

Joller N y col., 2010. Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(47):20441-6. doi: 10.1073/pnas.1013827107.

Jostins L y col., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582.

Jutila DB y col., 1994. Differences in the expression of Ly-6C on neutrophils and monocytes following PI-PLC hydrolysis and cellular activation. *Immunol Lett.*;41(1):49-57. doi: 10.1016/0165-2478(94)90056-6.

Kaiko GE y Stappenbeck TS, 2014. Host-microbe interactions shaping the gastrointestinal environment. *Trends Immunol* 35(11):538-48. doi: 10.1016/j.it.2014.08.002.

Kamada N y col., 2015. Humoral Immunity in the Gut Selectively Targets Phenotypically Virulent Attaching-and-Effacing Bacteria for Intraluminal Elimination. *Cell Host Microbe*. 17(5):617-27. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.001.

Kapellos TS y col., 2016. A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochem Pharmacol* 15;116:107-19. doi: 10.1016/j.bcp.2016.07.011.

Karaki S y col., 2007. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *Journal of Molecular Histology* 39(2), 135–142. doi: 10.1007/s10735-007-9145-y.

Kasuga M y col., 1981. Insulin-induced receptor loss in cultured human lymphocytes is due to accelerated receptor degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78(11):6917-21. doi: 10.1073/pnas.78.11.6917

Khanna KM y col., 2007. In situ imaging of the endogenous CD8 T cell response to infection. *Science*. 318(5847):116-20. doi: 10.1126/science.1146291.

Kitamura D y col., 1991. A B Cell-Deficient Mouse by Targeted Disruption of the Membrane Exon of the Immunoglobulin Mu Chain Gene. *Nature* 350 (6317), 423-6. doi: 10.1038/350423a0.

Kiyoshi M y col., 2015. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcRI. *Nat Commun* 6.6866. doi: 10.1038/ncomms7866.

Kleessen B y col., 2002. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 37:1034-1041. doi: 10.1080/003655202320378220.

Kobayashi K y col., 2009. An FcRn-dependent role for anti-flagellin immunoglobulin G in pathogenesis of colitis in mice. *Gastroenterology* 137(5):1746-56.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.059.

Koch MA y col., 2016. Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell*. 165(4):827-41. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.055.

Krausgruber T y col., 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12(3):231-8. doi: 10.1038/ni.1990.

Kress H y col., 2007. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11633-11638. doi: 10.1073/pnas.0702449104.

Kusumi A y col., 2005. Paradigm Shift of the Plasma Membrane Concept From the Two-Dimensional Continuum Fluid to the Partitioned Fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, 351-378. doi: 10.1146/annurev.biophys.34.040204.144637.

Laborde EA y col., 2007. Immune Complexes Inhibit Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 179 (1) 673-681. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.673.

Lee PY y col., 2013. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol*. 94(4):585-94. doi: 10.1189/jlb.0113014.

Libertucci J y col., 2018. Inflammation-related differences in mucosa-associated microbiota and intestinal barrier function in colonic Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 315(3):G420-G431. doi: 10.1152/ajpgi.00411.2017.

Lin HH y col., 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 201 (10):1615–1625. doi: 10.1084/jem.20042307

Lin R y col., 2018. Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease. *J Transl Med* 16: 359. doi: 10.1186/s12967-018-1723-0.

Lin XH y col., 2019. IgG plasma cells initiate changes in the protein C system in mouse ulcerative colitis through CD14+CD64+ macrophage activation. *Adv Clin Exp Med*. 28(8):1101-1110. doi: 10.17219/acem/94160.

Lu J y col., 2011. Crystal structure of Fc receptor I and its implication in high affinity -immunoglobulin binding. *J Biol Chem*. 286, 40608–40613. doi: 10.1074/jbc.M111.257550.

Macpherson AJ y col., 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288(5474):2222-6. doi: 10.1126/science.288.5474.2222.

Macpherson AJ y col., 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1(1):11-22. doi: 10.1038/mi.2007.6.

Maloy KJ y Powrie F, 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474(7351):298-306. doi: 10.1038/nature10208.

Manabe Y y col., 2019. The Core Fucose on an IgG Antibody is an Endogenous Ligand of Dectin-1. *Angew Chem Int Ed Engl*. 58(51),18697-18702. doi: 10.1002/anie.201911875.

Maravillas-Montero JL y col., 2015. Cutting edge: GPR35/CXCR8 is the receptor of the mucosal chemokine CXCL17. *J Immunol* 194(1):29-33. doi: 10.4049/jimmunol.1401704.

Maslowski KM y Mackay CR, 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 12(1):5-9. doi: 10.1038/ni0111-5.

Matteoli G y col., 2010. Gut CD103+ Dendritic Cells Express Indoleamine 2,3-dioxygenase Which Influences T regulatory/T Effector Cell Balance and Oral Tolerance Induction. *Gut*. 59 (5), 595-604. doi: 10.1136/gut.2009.185108.

Mauer J y col., 2014. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol* 15(5):423-30. doi: 10.1038/ni.2865.

McDonald KG y Newberry RD, 2007. Whole-mount techniques to evaluate subepithelial cellular populations in the adult mouse intestine. *BioTechniques* 43:50-56. doi 10.2144/000112514.

McKnight AJ y Gordon S, 1996. EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules. *Immunol Today* 17(6):283-287. doi: 10.1016/0167-5699(96)80546-9.

Mellman IS y col., 1983. Internalization and degradation of macrophage Fc receptors during receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol*. 96(3):887-95. doi: 10.1083/jcb.96.3.887.

Michl J y col., 1983. Fc receptor modulation in mononuclear phagocytes maintained on immobilized immune complexes occurs by diffusion of the receptor molecule. *J Exp Med* 157:2121-2139. doi: 10.1084/jem.157.6.2121.

Mikulic J y col., 2017. SlgA-Shigella Immune Complexes Interact with Dectin-1 and SIGNR3 to Differentially Regulate Mouse Peyer's Patch and Mesenteric Lymph Node Dendritic Cell's Responsiveness. *J Mol Biol* 21;429(15):2387-2400. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.024.

Mondot S y Lepage P, 2016. The human gut microbiome and its dysfunctions through the meta-omics prism. *Ann N Y Acad Sci* 1372(1):9-19. doi: 10.1111/nyas.13033.

Moon C y col., 2015. Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature* 521:90–93. doi: 10.1038/nature14139.

Mowat AM y col., 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14(10):667-85. doi: 10.1038/nri3738.

Mowat AM y col., 2017. Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nat Med* 23(11):1258-1270. doi: 10.1038/nm.4430.

Netea MG, 2014. Immunological memory in innate immunity. *J Innate Immun* 6(2):117-8. doi: 10.1159/000357283.

Niess JH, 2010. What are CX3CR1+ mononuclear cells in the intestinal mucosa? *Gut Microbes* 1(6):396-400. doi: 10.4161/gmic.1.6.13939.

Norton SE y col., 2016. Gut macrophage phenotype is dependent on the tumor microenvironment in colorectal cancer. *Clin Transl Immunology* 5(4):e76. doi: 10.1038/cti.2016.21.

Ohsaki A y col., 2017. Maternal IgG immune complexes induce food allergen-specific tolerance in offspring. *J Exp Med*. 215(1):91-113. doi: 10.1084/jem.20171163.

Pabst O, 2012. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 12:821–32. doi: 10.1038/nri3322.

Palframan RT y col., 2011. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 194(9):1361–1373. doi: 10.1084/jem.194.9.1361.

Palm NW y col., 2014. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 158(5):1000-1010. doi:10.1016/j.cell.2014.08.006.

Park JS y col., 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-

kappaB and ERK signaling pathways. *International Immunopharmacology* 7(1), 70–77. doi:10.1016/j.intimp.2006.08.015.

Pedrotti LP, 2003. La influencia de la Interleuquina 12 sistémica en la Homeostasis Intestinal. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, FCQ-UNC. 27/11/2013.

Pedrotti LP y col., 2016. Systemic IL-12 burst expands intestinal T-lymphocyte subsets bearing the $\alpha_4 \beta_7$ integrin in mice. *Eur J Immunol* 46(1):70. doi: 10.1002/eji.201545585.

Pedrotti LP y col., 2017. Intestinal mononuclear cells primed by systemic interleukin-12 display long-term ability to aggravate colitis in mice. *Immunology*. 150(3): 290–300. doi: 10.1111/imm.12685.

Peterson DA y col., 2007. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2, 328–339. doi: 10.1016/j.chom.2007.09.013.

Platt AM y Mowat AM, 2008. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* 119(1-2):22-31. doi: 10.1016/j.imlet.2008.05.009.

Porcheray F y col., 2005. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 142(3):481-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.

Poritz LS y col., 2007. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*. 140(1):12-9. doi: 10.1016/j.jss.2006.07.050.

Postler TS y col., 2017. Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab* 26:110–130. doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.008.

Pull SL y col., 2005. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1):99-104. doi: 10.1073/pnas.0405979102.

Ramachandran P y col., 2012. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: E3186–E3195. doi: 10.1073/pnas.1119964109.

Rochereau N y col., 2013. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol* 11(9):e1001658. doi: 10.1371/journal.pbio.1001658.

Rogier EW y col., 2014. Secretory IgA is Concentrated in the Outer Layer of Colonic Mucus along with Gut Bacteria. *Pathogens.* 3(2):390-403. doi: 10.3390/pathogens3020390.

Rougerie P y col., 2013. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol Rev.* 256(1):222-39. doi: 10.1111/imr.12118.

Sack U, 2017. CD64 expression by neutrophil granulocytes. *Cytometry B Clin Cytom* 92(3):189-191. doi: 10.1002/cyto.b.21216.

Sahlin S y col., 1983. Differentiation between attached and ingested immune complex by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *Journal of Immunological Methods* 60, 115–124. doi: 10.1016/0022-1759(83)90340-x.

Santos EO y col., 2015. Optimization of a flow cytometric assay to evaluate the human neutrophil ability to phagocytose immune complexes via Fcγ and complement receptors. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 72:67-71. doi: 10.1016/j.vascn.2014.10.005.

Schulz D y col., 2019. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Sci Rep* 9, 1925. doi: 10.1038/s41598-018-38127-9.

Schulz O y col., 2009. Intestinal CD103+, but Not CX3CR1+, Antigen Sampling Cells Migrate in Lymph and Serve Classical Dendritic Cell Functions. *J Exp Med* 206 (13), 3101-14. doi: 10.1084/jem.20091925.

Sena AA y col., 2015. Lack of TNFR1 signaling enhances annexin A1 biological activity in intestinal inflammation. *Biochem Pharmacol* 98(3):422-31. doi: 10.1016/j.bcp.2015.09.009.

Shroff KE y col., 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 63:3904-3913.

Simón Soro Á y col., 2015. Revealing microbial recognition by specific antibodies. *BMC Microbiol* 15:132. doi: 10.1186/s12866-015-0456-y.

Slack E y col., 2009. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 325(5940):617-20. doi: 10.1126/science.1172747.

Smith PD y col., 2001. Intestinal Macrophages Lack CD14 and CD89 and Consequently Are Down-Regulated for LPS- And IgA-mediated Activities. *J Immunol* 167 (5), 2651-6. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2651.

Smith PD y col., 2011. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 4(1):31-42. doi: 10.1038/mi.2010.66

Smith PM y col., 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 341(6145):569-73. doi: 10.1126/science.1241165.

Smythies LE y col., 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115:66–75. doi: 10.1172/JCI19229.

Steinert A y col., 2016. Gastro-intestinal tract: The leading role of mucosal immunity. *Swiss Med Wkly* 146:w14293. doi: 10.4414/smw.2016.14293.

Steinman RM y col., 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 96(1):1-27. doi: 10.1083/jcb.96.1.1.

Sterlin D y col., 2020. Human IgA Binds a Diverse Array of Commensal Bacteria. *J Exp Med* 217 (3).doi: 10.1084/jem.20181635.

Su L y col., 2009. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 136(2):551-63. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.081.

Tacke F y col., 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117(1):185–194. doi: 10.1172/JCI28549.

Tacke F y Zimmermann HW, 2014. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 60(5):1090-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.025.

Tamoutounour S y col., 2012. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol.* 42(12):3150-66. doi: 10.1002/eji.201242847.

Tazoe H y col., 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol Suppl* 2:251-62.

Teegen B y col., 2009. DNA-bound Lactoferrin Is the Major Target for Antineutrophil Perinuclear Cytoplasmic Antibodies in Ulcerative Colitis. *Ann N Y Acad Sci* 1173, 161-5. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04752.

Thibodeau J y col., 2008. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol* 38(5):1225-30. doi: 10.1002/eji.200737902.

Toei M y col., 2010. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry.* 2010 49(23):4715-23. doi: 10.1021/bi100397s.

Tordesillas L y col., 2018. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* 55 (2), 107-117. doi: 10.1007/s12016-018-8680-5.

Treanor B y col., 2010. The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor. *Immunity* 32:187-199. doi: 10.1016/j.immuni.2009.12.005.

Ukkonen P y col., 1986. Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes. *J Exp Med.* 163(4):952-71. doi: 10.1084/jem.163.4.952

Underhill DM y Ozinsky A, 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825–852. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744

Uo M y col., 2013. Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through FcγR-mediated CD14 macrophage activation. *Gut.* 62(12):1734-44. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303063.

van der Meer W y col., 2007. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res* 13(2):94-100. doi: 10.1177/0968051907079101.

van der Waaij LA y col., 2004. Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 16(7):669-74. doi: 10.1097/01.meg.0000108346.41221.19.

Walker WA y col., 2011. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 11:7. doi: 10.1186/1471-2180-11-7.

Wang G y col., 2019. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell Mol Life Sci* 76(20):3917-3937. doi: 10.1007/s00018-019-03190-6.

Wang YY y col., 2017. Influenza-binding antibodies immobilise influenza viruses in fresh human airway mucus. *Eur. Respir. J.* 49 (1),1601709. doi: 10.1183/13993003.01709-2016.

Warschkau H y Kiderlen AF, 1999. A Monoclonal Antibody Directed Against the Murine Macrophage Surface Molecule F4/80 Modulates Natural Immune Response to *Listeria Monocytogenes*. *J Immunol* 163 (6), 3409-16.

Weischenfeldt J y col., 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc.* doi: 10.1101/pdb.prot5080.

Weiss GA y Henet T, 2017. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci* 74(16):2959-2977. doi: 10.1007/s00018-017-2509-x.

Weisz-Carrington P y col., 1977. Plasma cells and epithelial immunoglobulins in the mouse mammary gland during pregnancy and lactation. *J Immunol.* 119(4):1306-7.

Wernet P y col., 1971. Antibacterial Action of Specific IgA and Transport of IgM, IgA, and IgG from Serum into the Small Intestine. *J Infect Dis* 124(2):223-6. doi: 10.1093/infdis/124.2.223.

Wojtal KA y col., 2012. Fc gamma receptor CD64 modulates the inhibitory activity of infliximab. *PLoS One* 7(8):e43361. doi: 10.1371/journal.pone.0043361.

Xu F y col., 2019. Modeling Barrier Properties of Intestinal Mucus Reinforced with IgG and Secretory IgA against Motile Bacteria. *ACS Infect Dis.* 5(9):1570-1580. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00109.

Yoshida M y col., 2006. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J Clin Invest* 116(8):2142-2151. doi: 10.1172/JCI27821.

Yrlid U y col., 2006. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 176(7):4155-4162. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4155.

Zeng MY y col., 2016. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity* 44(3):647. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.006.

Zhou D y col., 2014. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal* 26(2):192-7. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.

Zigmond E y col., 2012. Ly6Chi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 37:1076–90. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.026.

Publicaciones en Revistas con Referato

- Pedrotti LP, Barrios BE, **Maccio Maretto L**, Bento AF, Sena AA, Rodríguez Galán MC, Calixto JB, Correa SG. “Systemic IL-12 burst expands intestinal T-lymphocyte subsets bearing the $\alpha 4 \beta 7$ integrin in mice”. European Journal of Immunology. Eur J Immunol, 2016, 46 (1), 70-80.
- De Paula-Silva M, Barrios BE, **Maccio Maretto L**, Sena AA, Farsky SH, Correa SG, Oliani SM. “Role of the protein annexin A1 on the efficacy of anti-TNF treatment in a murine model of acute colitis”. Biochemical Pharmacology, 2016, 115, 104-13.
- Novotny Nuñez I, Barrios BE, **Maccio Maretto L**, Correa SG. “Migratory capacity and function of dendritic cells from mesenteric afferent lymph nodes after feeding a single dose of vitamin A”. Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 49, 110-116.
- Barrios BE, **Maccio Maretto L**, Nazar FN, Correa SG. “A selective window after the food-intake period favors tolerance induction in mesenteric lymph nodes”. Mucosal Immunology, 2019, 12 (1), 108-116.
- **Maccio Maretto L**, Barrios BE, Denning TL, Correa SG. “IgA⁺IgG⁺ coated bacteria from feces of mice with colitis become singular stimuli for colonic CD64^{hi} and CD64^{int} macrophages”. En preparación.

Agradecimientos

Qué difícil el momento de agradecer. No la acción en sí misma, sino la decisión de por dónde comenzar, el miedo de olvidarse de alguien, la sensación de que las cosas por agradecer son infinitas y realmente no alcanzan las palabras disponibles en nuestro idioma para hacerlo extensivo a todas ellas. Aún corriendo esos riesgos, creo que es el momento más bonito de un trabajo en el que se pone tanto esfuerzo, tanta cabeza, tantas lágrimas y, sobre todo, el corazón.

Quiero agradecer la hermosa bendición de haber nacido en este país tan hermoso, y tan generoso. Agradecer la dicha, y el privilegio, de haber nacido en el seno de una familia que me llenó de amor, me enseñó valores que llevo conmigo donde quiera que vaya, me demostró con su ejemplo que lo importante no es ser la mejor, sino es siempre luchar por superarse a una misma, respetar al otro, agradecer y ser amable con los demás. Sin saberlo quizás, el gran legado que me dejaron permitió que a lo largo de mi vida y mi carrera, pudiera replantearme cosas, generar nuevos puntos de vista, comprender que el otro es simplemente eso, otro, con otras experiencias, otros caminos recorridos, otros saberes adquiridos, pero con los mismos derechos y la misma libertad.

Quiero agradecerte mamá, Ivanna, por apoyarme siempre. Por ser siempre el empujoncito (o “empujonsote”) que me faltaba para animarme a concretar sueños. Por creer siempre en mí, en mis capacidades, en mis locuras, y por dejarme ser, a veces muy a tu pesar. Por animarte a crecer y aprender junto conmigo. Por tu entrega sin condiciones. Gracias por ser mi pilar emocional a lo largo de todas las etapas de mi vida, a veces bancándote horas y horas de llamadas telefónicas de llantos y miedos, haciendo todo lo que estaba a tu alcance para poner una sonrisa en mi rostro otra vez. Por los paseos por Córdoba, de compras de Navidad, en las que “somos un peligro”. Por tener siempre un detalle especial, o una sorpresa preparada, por ser mi cómplice y mi fan número uno. Má, sin saberlo, contribuiste

enormemente a crear mi espacio, ese en el que me siento auténtica, ese al que recurro cuando estoy feliz, pero que también es mi refugio en mis momentos de dolor, ése en el que sencillamente SOY. Te amo, GRACIAS.

Pá, gracias por el tiempo compartido. Gracias por la sonrisa amable y modesta. Gracias por hacerme conocer el placer de la lectura. Porque siendo muy chiquita me hiciste comprender lo peligroso y doloroso de la intolerancia, la represión y la tortura, entendiendo que jamás puedo estar del lado de los que eligen imponer su pensamiento a base de violencia. Gracias por cultivar en mí la curiosidad, por las charlas “académicas”, por cada libro traído de tus viajes a Córdoba, por siempre decirme que yo tenía que estudiar y ser independiente, que ésa era la única herencia que vos podías dejarme. Por haberme contagiado tu amor por la Docta, que fue testigo de mi crecimiento personal y profesional. Por haberme dicho que te gustaría que fuera médica o científica, a pesar de que yo te decía que ni loca. Y mirá las vueltas de la vida, hoy soy “la Doctora Macció”, tal como querías jajaja. Te fuiste muy pronto y nos dejaste un espacio vacío en el corazón. Éste trabajo es para vos, donde quiera que se encuentre tu alma, viejo, te amo.

El siguiente “gracias” va para mi enano. Ése que terminó siendo más alto que yo, y mucho más bueno. El callado, el “catrasca”, el generoso que siempre que pedía un postrecito en el súper, traía uno para su hermana. Gracias, Gian, por ser mi compañero de aventuras, de juegos y de peleas. Gracias por tantos momentos compartidos entonces, y ahora, por divertirnos tanto bailando y haciendo tonteras juntos. Por haberme bancado en las buenas, y por haberme querido aun cuando ni yo me hubiera querido. Gracias por decirme las cosas que no quiero escuchar, y por inspirarme a ser mejor a cada momento. Gracias por los fuertes (aunque esporádicos) abrazos, y por tu particular manera de hacerme sentir tu cariño. Gracias por alegrarte por mis logros y acompañarme siempre. Gracias por

compartirme un poco a Pau también, y gracias a vos, Pau, por tu calidez, por complotarte conmigo para pelear a Gian, por las risas y los momentos compartidos, que aunque no sean tantos, son hermosos y estoy feliz de que formes parte de nuestra familia. Los amo.

Un agradecimiento muy especial va para mi Tini, mi segunda mamá. Gracias por la infinita paciencia de casi toda mi vida. Gracias por tu sacrificio y tu amor. Por bancarte a dos niños molesstos y jodidosss como dices vos. Por consentirme y por enseñarme que madre no es solamente quien te da la vida, sino quién elige cuidarte y quererte todos los días, sin condiciones. Por tus “hola negra fieraaa” y preguntarme qué quiero almorzar cada vez que vuelvo a casa. Por compartirme a Julián y decirme que me extrañas y me quieres mucho cada vez que hablamos. Gracias por estar en mi vida, te amo Tini.

Quizás pueda parecer muy extensa, pero creo firmemente que la serie de acontecimientos que ocurrieron en mi vida me trajeron a este momento, y sin duda nunca hubiera llegado de no ser por cada una de las hermosas personas que dejaron una huella en mi corazón. Y un apartado especial merecen mis amigas de la facu. Pau, siempre recuerdo que le dije a mi mami “ojalá la chica de Catamarca me toque en la misma habitación” de la resi, y soy feliz de haber pedido ese deseo y que se me haya concedido! Gracias por haber sido mi primera amiga en Córdoba (y seguir bancándome ahora!), por las noches de risas y llantos en la resi, por tu hermosa locura, tu discreta y delicada (ja) risa, por tu enorme amistad y por la belleza de persona que sos. Andu, gracias por haberte sentado en el banco de al lado con tanta soltura esa primera clase de Química General I, iniciando esta amistad tan chiflada que tenemos, en la que nos emocionamos (demasiado) por pequeñeces, planeamos viajes, sacamos becas y nos vamos a los mismos lugares, y hasta nos recibimos, prácticamente al mismo tiempo, gracias por no decirme nunca que “no”. Lu, mi peque, mi minúscula, gracias por ser la civilizada del grupo jajaja

gracias por divertirme tanto con tus ocurrencias, por ser tener siempre una sonrisa dulce y una palabra de aliento y un corazón que es más grande que tu propio cuerpo (aunque todas sabemos que el veneno viene en frasco chico jaja), por estar siempre dispuesta a tomar unos mates, con una charla larga y algo rico de por medio. Vi, gracias por ser mi pisciana hiper colgada preferida y mi mejor compañera de memes y videos tontos (de esos que nos reímos por horas), por ser la fuente de sabiduría de este grupo, la que explicaba pacientemente las dos mil cosas que todavía no habíamos aprendido para el parcial, la que siempre te tira la posta, gracias por estar siempre presente, aun a la distancia en medio de la cuarentena y con diferencia horaria jaja. Sol, gracias por las largas tardes de estudio en la vecindad, cuando casi no nos conocíamos, gracias por las fiestas organizadas en tu departamento o en la casa de Crico, por las terribles juntadas con el Ale, asadito y lemon pie de por medio, por haber sido mi compañerita de las prácticas y prenderte siempre en todas mis locuras. A las cinco quiero agradecerles lo incondicional de su amistad, por acompañarme siempre, en los buenos momentos, y también en mis épocas más oscuras, sin juzgarme y sin intentar cambiarme, simplemente estando ahí para mí. Las amo.

Los momentos de adversidad suelen ser dolorosos, difíciles de llevar, y darte muchísimo miedo. Sin embargo, también suelen ser excelentes oportunidades de aprendizaje. Comencé mi doctorado casi al mismo momento de perder a mi papá, fueron tiempos muy tristes y además no conocía a nadie en el CIBICI, no tenía idea de a lo que me estaba enfrentando. Y por alguna obra misteriosa del universo, me encontré formando parte de mi amado 104. La vida me quitaba a mi papá, pero, aunque no lo supe en ese momento, me estaba regalando hermanas, un grupo inmenso de hermanas que se iban a convertir en mi red y mi sostén de ahí en más. Las primeras en hacerme parte fueron mis Correitas, Bibi e Ivi, ay, ¿cómo escribir esto sin llorar? ¿Cómo agradecerles apropiadamente el cálido abrazo y la

contención emocional que encontré en ustedes? ¿Cómo agradecer la tremenda fortuna de haberlas tenido como mis compañeras de grupo? Bibita, gracias por los experimentos a las 5 de la mañana jaja parece una locura agradecerte por eso, pero qué divertido fue llegar, preparar unos mates y arrancar la mañana con el laboratorio sólo para nosotras, escuchando a todo lo que daba Ricky Martin o Maluma beibiiii para no dormirnos, las charlas en los tiempos de incubación, a veces sumamente profundas y a veces puras boludeces, qué divertido tentarnos hasta que nos dolía la panza o no podíamos respirar con alguna pavada o un video, gracias por seguir siendo mi compañerita cómplice, gracias por enseñarme, aconsejarme, escucharme y a veces retarme. Mami Ivi, gracias por abrirme las puertas de tu corazón, de tu casa, y de tu heladera jajajajaja nos bastaron solamente un par de horas para hacernos grandes amigas, me compartiste a tu familia, a Gery, a Sofi y Santi, y un par de añitos más tarde a Agus, siempre sintiéndome parte, siempre haciéndome sentir parte. Tu alma de mamá y tu terraza con los mates (o la cervecita) siempre preparados para morirnos de risa o para escucharme llorar a mares son recuerdos que voy a tener siempre en mi corazón. Gracias por existir y ser mi dulce amiga, gracias por todo lo vivido juntas, gracias por solamente mirarnos y estallar en carcajadas escandalosas jajaja. No te me pongas celosa mi pseudo-Correita, para vos también hay jajaja, gracias Ceci, mi gato, cuánto aprendí de vos, primero porque terminaste consiguiendo que tomara cerveza, jajajaja segundo, porque aun con nuestras fuertes personalidades (yo no soy terca, vos sos terca jajajaja) siempre encontramos un hermoso equilibrio y una especie de complementariedad, no sabría decirte cuántas veces abriste mi mente aun sin buscarlo y con vos aprendí la tolerancia y a tener opiniones diferentes respetándonos, gracias por tantas tardes de mate, parque y cervveeeezas, gracias por Bolivia, y gracias por Martiina mi preciosa sobrina. Gracias Sole, mi víbora favorita, por haberme acogido como tu “discípula” de maldades, por tu hermosa

incondicionalidad ya sea para ir a tomar un helado o para hacer una mudanza, por ser una persona con la que se puede contar para absolutamente todo, por prenderte en tooodos los planes que te propongo como ir a la feria del libro, o ir a verme bailar en el parque, por las capturas de pantalla donde nos hemos reído de muchas cosas, pero donde también hemos aprendido (como las historias de Flor Freijo), porque de alguna manera hemos empezado un camino de “deconstrucción” juntas y es hermoso compartirlo con vos. Emi (♀) gracias por las charlas compartidas en el box Soto-Correa, luego de intentar estar concentradas trabajando o estudiando, gracias porque a pesar de molestarte siempre por ser la “calladita”, estás firme acompañando para dar palmaditas en la espalda (jajajaja en eso somos iguales, no sabemos bien qué hacer cuando alguien llora), jaja hablando en serio, gracias por estar siempre dispuesta a hablar, a aconsejar, por reírnos o indignarnos de las mismas cosas, gracias por complotarte con la Bibiana en el curso de mucosas para hacerme burla por Tim jajaja por los momentos tan hermosos compartidos juntas. Conito inundo, gracias por esa chispa que tenés, por hacerme morir de risa con tus ocurrencias, por tener siempre el corazón y la casa dispuesta para juntadas a matear, a festejar, a chusmear o a dar malas noticias, gracias por contagiar ese entusiasmo tan lindo que tenés, y por esa risita también tan contagiosa, por estar siempre pendiente de cada una de nosotras, y siempre en los detalles para hacernos sentir tu cariño, y por habernos recomendado a todas para tener las tarjetas del banco Francés jajajaja. Nati hermosa, gracias por la calidez de tu corazón y de tus abrazos, gracias por los consejos llenos de amor cuando estaba triste o incluso encaprichada, gracias por ser siempre la que ponía paños fríos cuando algún malentendido surgía, gracias por los Group-on para comprar “cafés ricos”, por compartirnos a tu “Nati-combo” (ahora agrandado), por la sonrisa dulce y la alegría genuina cada vez que algo lindo me pasaba. Negra Godoy, gracias por las risas interminables, tus historias llenas de “sal”, las historias

de Alfonsina y todas las salidas tremendas que tuvimos (cuando todavía eras chévere jaja), gracias como dijiste vos por las miradas cómplices y por odiar a las mismas personas jajaja gracias por estar siempre, aun ya viviendo en otro continente, acompañándome y dándome ánimos. Florrr gracias por ser mi compañera del norte, por explicar esas cosas tan comunes para nosotras, que para las otras eran “raras” (aunque te reías de mir “r”, maldita jaja), gracias por tu energía tan pura, tan hermosa y contagiosa, por tus bailes reggaetoneros, por tu predisposición a ayudar en lo que sea y cuando sea, por seguir siempre presente aun cuando ya no estabas más en el lab. Parayaaaa, gracias por tus locuras, gracias por hacerme reír con tus canciones y bailes inventados, por las charlas cuando volvíamos al dpto, por las tardes de estudio donde nació “Amemos las Treg”, por hacerte siempre presente con un “hola mamuuuuu” o un “hola muertaaa” aun en tiempos difíciles, poniéndole buena onda. Carolain, gracias por compartirnos tus historias familiares que califican para un libro, por hacernos reír con tus comentarios dichos completamente seria, lo que hacía que fuera aún más gracioso, gracias por aceptar mis abrazos aunque odies dar abrazos y gracias por sumarte al “team Norte” para defender nuestras raíces (?). Danielita, gracias por tener siempre la información más completa a la orden, por tu predisposición para explicar, o simplemente dar una mano, por recibirme siempre con una sonrisa y un dulce “hola Li, como estás, tanto tiempo?”, gracias por tu organización y prolijidad y por ser esa vocecita que decía “acuérdense de pagar la cuota de SAI” jajaja. Todas y cada una de ustedes, con sus personalidades particulares, y sus pequeñas anécdotas y actitudes, contribuyeron a que mi día a día en este camino que inicié en 2014 fuera hermoso, a que me sintiera cómoda y tuviera realmente ganas de ir al laboratorio a trabajar, porque sin importar que fuera un buen o un mal día, ustedes estaban ahí para mí, para todas. Le deseo a todo el mundo un grupo de

trabajo y de amigas como el que se moldeó entre nosotras. Las quiero con todo mi corazón, para siempre.

No puedo dejar afuera al Emi (♂), a pesar hacerte el arisco y el antisocial, gracias por enseñarme y explicarme con (bastante) paciencia, me hiciste reír muchas veces con tus frases haciéndote el picante y con tus intentos de hacerme asustar (que nunca lo lograste, por cierto) jajaja. Gracias por hacerme el aguante muchas veces y por animarme siempre a crecer y a avanzar en este mundo científico que a veces desilusiona y que también da tanto miedo. Gracias también al Leíto, nuestro meteorólogo, por tu amistad tan sincera, por tus consejos dados a través de la mesada Soto, por ser un poco nuestro “psicólogo” también. Gracias Jenny, mi parce, que más pues? Por tu hermosa amistad que se mantiene a través de los años y de la distancia, que verraca amistad! Estoy agradecida por la compañía, el amor y los consejos que me brindaste, y no puedo esperar para volver a verte y conocer a Isa!

Vir, mi Correíta más reciente, lamentablemente el tiempo compartido fue poco, porque aunque hace más de un año que nos conocemos, justo compartimos el año en que menos tiempo pasé en el lab, sin embargo es más que suficiente para quererte un montón y saber que sos una hermosa persona y que espero que podamos conservar esta amistad y complicidad que está apenas naciendo, gracias por escucharte todos mis ensayos de la tesis y por esforzarte en hacerme preguntas y aportar, perdón por ser una mala “hermana mayor” y soltarte la mano tan temprano jajaja. Estefi, Lu, Sofi, Jere, Sile y Clari, con ustedes también compartí bastante poco, pero les agradezco la buena onda, los ánimos, las risas y los festejos, les agradezco el aguante, y les deseo que encuentren entre ustedes la contención, la cooperación y la buena vibra que yo sentí siempre en el 104, aunque ya no se llame más 104 jajaja, que se ayuden entre ustedes y ayuden a otros desinteresadamente, que las cosas buenas terminan siempre por llegar.

Un párrafo súper especial se merece (aunque corra el riesgo de que se me tilde de chupamedias), mi directora, Silvia. Desde el momento cero has sido una fuente de contención y confianza para mí. Fuiste sumamente comprensiva cuando pasó lo de mi papá, e incluso después. Supiste y entendiste de mis migrañas, y hasta aprendiste a identificar sólo por mi rostro que estaba teniendo una. Recuerdo tu dulzura diciéndome que me fuera a mi casa a descansar, que ya había hecho lo suficiente y siento un profundo agradecimiento. Porque sin ánimos de adular, creo que has representado para mí todo lo que considero que una buena mentora debería ser. Me has formado como científica con la excelencia de pocos, y con la humildad de los grandes. No te has olvidado jamás de saludarme para mi cumpleaños, aun cuando la fecha es bastante complicada, ni de mandar un mensajito de ánimos antes de algún evento especial. Hasta me has ido a ver bailar en la Fiesta de la Virgen de Urkupiña, y has desayunado conmigo antes de mi viaje a Atlanta. Me has enseñado de proyectos experimentales, cómo hablar apropiadamente frente a una audiencia, a escribir un trabajo científico, a razonar críticamente, pero sutilmente y con tu ejemplo me has enseñado a ser siempre justa, a ser comprensiva, a escuchar, a sensibilizarme con los demás. Te agradezco por demostrarme que se puede hacer ciencia apasionadamente sin perder la humanidad. Te agradezco la confianza depositada en mí y en mi trabajo, te agradezco inmensamente el cariño que me has dado, y espero haber estado a la altura de las circunstancias y que te hayas sentido orgullosa de mí. Te quiero un montón.

Agradezco también la hermosa casualidad de la gente que pude conocer a través de Silvia. Gracias Clau, por el cariño casi inmediato que se generó entre vos y yo, te agradezco que hayas sido parte de comisión de Tesis, tus sugerencias para mejorar mi trabajo, y también para que me luzca con él, gracias por el apoyo de siempre y el cariño que me brindaste todos estos años. No pienses que me voy a

olvidar del locro que me prometiste para mi despedida jajaja. También quiero agradecerles a Pau Icely, Ceci y Mariana por su calidez conmigo. Gracias Pablo, por la cantidad de oportunidades y puertas que me has abierto tan desinteresadamente, gracias en primer lugar por recomendarme con Tim para hacer mi pasantía en Atlanta, gracias por confiar en mi para sumarme a tu equipo de trabajo como postdoc, gracias por los “aprendizajes del día” y por toda la información que me proporcionas para ayudarme a crecer como científica y como persona, gracias por entenderme estos meses que estuve terminando la tesis, gracias por los festejos de mis logros y por hacerme sentir una más de ustedes. Gracias también a Marina, José, Dani, Ani, Male, Pato, Noe, Martín, Carlos, Laura y Moni, por el cálido recibimiento y por el hermoso ambiente de trabajo del CIMETSA, extraño mucho los días con ustedes, los viernes de “descontrol” como rebauticé a los viernes de exceso jajaja y las salidas culturales a probar comidas nuevas.

Gracias a todas esas personas que me quieren, me acompañan y me apoyan. Cada una de ellas desde su lugar ha sido parte importante de este logro tan grande aunque no hayan participado directamente de él. Gracias a la gente de los lab 103, 108, 109, 6, 8 y 9 que siempre me alegraron con toda su buena onda, gracias a las chicas del citómetro, Pau, Pili y Estefi, que se bancaron mis experimentos larguíiiiiisimos de sorting de macrófagos y bacterias (aunque Paula decía que mis experimentos eran una caca, cuack!), gracias a la paciencia de las chicas y los chicos de bioterio y de cultivo. También gracias a mis amigas y amigos de la vida, a mi familia entera, tíos, primos, tanto a los de sangre como a los de cariño, no quiero nombrar gente porque no quiero olvidarme de nadie, así que a mis amigos de la facu, de folklore, de caporales, del hospi, los que conozco de lugares que ya ni existen, gracias por el amor y el acompañamiento.

Finalmente, quiero agradecer a la Educación pública, gratuita, laica y de calidad que permitió que hoy sea una profesional, a las entidades que hicieron

posible que llevara adelante este trabajo de Tesis (CONICET, SECyT, FCQ, UNC y Fulbright –Ministerio de Educación) y a todos aquellos que luchan por nuestro derecho a que todos y todas tengamos el acceso a la educación y la oportunidad de realizar nuestro sueños.

“Nuestras almas al flotar son las nubes más brillantes. Demos un paseo, vuelta por el universo. Alto, cada vez más alto.” Gustavo Cerati.

Con muchísimo amor, y eternamente agradecida,

Lisa