



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

“Impacto de la inflamación crónica sobre el riesgo a la aloinmunización después de la transfusión de glóbulos rojos en un modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Luis Paolo Rojas Lemus

Director de Tesis: Arlek González Jamett

Codirector de Tesis: Juan Carlos Sáez Carreño

Julio / 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

“Impacto de la inflamación crónica sobre el riesgo a la aloinmunización después de la transfusión de glóbulos rojos en un modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Luis Paolo Rojas Lemus

Director de Tesis: Arlek González Jamett.

Codirector de Tesis: Juan Carlos Sáez Carreño.

Julio / 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Impacto de la inflamación crónica sobre el riesgo a la aloinmunización después de la transfusión de glóbulos rojos en un modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne.”

Luis Paolo Rojas Lemus

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Dra. Arlek González Jamett en el Laboratorio de Neurosecreción del Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV) y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Joan Villena.
Presidente Comisión

Dra. Caroline Weinstein
Profesor Informante

Dr. Sebastián San Martín
Profesor Informante

Dra. Arlek González Jamett Arlek
Directora de Tesis

Dr. Juan Carlos Sáez
Co-Director de Tesis

Valparaíso, Chile

2023

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante este camino. En primer lugar, agradecer a mi profesor guía, Alek González, por la paciencia y el conocimiento entregado. Además, a todas esas personas que me apoyaron en las diferentes disciplinas para concretar mi tesis María José Guerra, Álvaro Ardiles, Stefy Ordenes, Bárbara Gómez Claudio Córdova y Christian Carrillo, por su ayuda y buena disposición para realizar el trabajo en sus laboratorios. Finalmente, a mi familia por su comprensión y estímulo constante, además su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

ABREVIATURAS

Ag: Antígeno.

Alo-Ac: Aloanticuerpos.

CPD: Citrato-fosfato-dextrosa.

DAMP: Patrones moleculares asociados al peligro.

DMD: Distrofia muscular de Duchenne.

EDTA: El ácido etilendiaminotetraacético.

EHFRN: Enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido.

GR: Glóbulos rojos.

HMT: Homocigoto.

HZT: Heterocigoto.

LT: Linfocitos T.

NF-kB: Factor nuclear kappa beta.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PFA: Paraformaldehído.

RHT: reacciones hemolíticas.

SAGM: Solución salina-adenina-glucosa-manitol.

TLR: Receptores tipo Toll

WT: Wildtype.

ÍNDICE

1. RESUMEN	9
1. ABSTRACT	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1. Transfusión sanguínea.	11
2.2. Inflamación: mecanismos celulares y moleculares involucrados.	12
2.3 Aloinmunización.....	18
2.3.1. Características de los componentes sanguíneos:	19
2.3.2. Disparidad fenotipo donante – receptor:	19
2.3.3. Número de transfusiones versus número de unidades:	20
2.3.4. Factores inmunológicos:	20
2.4. Aloinmunización por transfusión de glóbulos rojos en un estado inflamatorio.	21
2.5. Distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	23
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO GENERAL (OG)	26
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE).....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1. Metodología general:	27
6.2. Diseño experimental:	28
6.3. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de IL6 y IL10 (OE1).....	30
6.4. Citometría de flujo para la detección de poblaciones de linfocitos T efectores (CD4+/CD86+) y linfocitos T reguladores (CD4+/Foxp3+) (OE2).	31
6.5 Detección de aloanticuerpos en sangre murina (OE3).	33
6.6. Cuantificación de hemólisis (OE4).	33
6.7 Análisis de los bazo mediante tinción con hematoxilina/eosina (OE5).	34
6.8. Análisis estadístico	35

6.9. Consideraciones bioéticas.....	35
7. RESULTADOS	36
8. DISCUSIÓN.....	49
9. CONCLUSIONES	55
10. BIBLIOGRAFÍA.....	56
11. ANEXOS.....	62
11.1 Anexo 1. Curva de Calibración.	62
11.2 Anexo 2. Descripción de pasos para realizar tinción Hematoxilina eosina (H&E). 64	
11.3 Anexo 3. Acta de evaluación Bioética.	65

1. RESUMEN

La transfusión sanguínea es un soporte terapéutico que puede producir anticuerpos como respuesta a la exposición de antígenos diferentes a los propios, es decir, aloinmunización. Está descrito que, en un estado inflamatorio, el riesgo a la aloinmunización aumenta. La presente tesis tuvo como objetivo evaluar si la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), una miopatía hereditaria causada por mutaciones en el gen de distrofina, la cual se manifiesta con una inflamación crónica de la musculatura esquelética, existe mayor riesgo a la aloinmunización. Durante este trabajo se utilizó como modelo experimental el ratón transgénico *mdxcv4*, modelo murino de DMD, homocigoto para una mutación en distrofina que suprime la expresión de la proteína. Como control se utilizaron sus contrapartes silvestres (WT) y heterocigoto (HTZ), los cuales fueron sometidos a dos actos transfusionales con glóbulos rojos provenientes de un ratón macho adulto sano (WT) de la cepa C57BL/6. Después de dos semanas de la primera transfusión, se midió en el plasma de los ratones: los niveles de la citoquina inflamatoria IL6 y antiinflamatoria IL10 mediante ELISA, se estimó la razón entre linfocitos T efectores/ T reguladores mediante citometría de flujo, se evaluó la presencia de aloanticuerpos mediante aglutinación en columna de gel, y el porcentaje de hemólisis inducida por aloanticuerpos mediante espectrofotometría. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de IL6 e IL10 entre ratones WT y los mutantes de distrofina, ni antes ni después de los actos transfusionales. En este estudio la cantidad de linfocitos presentes en las muestras analizadas por citometría de flujo fue muy bajo, insuficiente para evaluar si existían cambios en la población de linfocitos-T reguladores o efectores. No se evidenció aloinmunización ni hemólisis en los ratones *mdxcv4* transfundidos, en congruencia con ausencia de cambios en los marcadores inflamatorios. Sí fue cuantificable un 35% de esplenomegalia en los ratones *mdxcv4* sin transfundir y en los WT transfundidos en comparación a los ratones WT sin transfundir lo que podría ser indicativo de reactividad del sistema inmune en respuesta a la transfusión.

Palabras claves: inflamación, aloanticuerpos, aloinmunización, transfusión, Distrofia muscular de Duchenne

1. ABSTRACT

Blood transfusion is a therapeutic support that can produce antibodies in response to the exposure to foreign antigens, namely, alloimmunization. It has been described that inflammation increases the risk of immunization. The objective of this thesis was to evaluate whether in the context of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), a hereditary myopathy caused by mutations in the dystrophin gene, which manifests with chronic inflammation of the skeletal muscles, there is a greater risk of alloimmunization. During this work, we used the *mdxcv4* transgenic mouse, a murine model of DMD, homozygous for a dystrophin mutation that suppresses the expression of the protein. As a control, wild type (WT) and heterozygous (HTZ) mice were used, which were subjected to two transfusions with red blood cells from a healthy adult male mouse (WT) of the C57BL/6 strain. Two weeks after the first transfusion, was measured in the plasma of the transfused mice: the levels of the inflammatory cytokine IL6 and anti-inflammatory IL10 by ELISA, tried to estimate the ratio between effector/regulatory T lymphocytes by flow cytometry, the presence of alloantibodies by agglutination in a gel-column, and the percentage of hemolysis induced by alloantibodies by spectrophotometry. The results did not show significant differences in the levels of IL6 and IL10 between WT mice and dystrophin mutants, neither before nor after the transfusion events. In this study, the amount of lymphocytes present in the samples analyzed by flow cytometry was very low, insufficient to assess whether there were changes in the population of regulatory or effector T-lymphocytes. There was no evidence of alloimmunization or hemolysis in the transfused *mdxcv4* mice, consistent with the absence of changes in inflammatory markers. Yes, 35% splenomegaly was quantifiable in the *mdxcv4* mice without transfusion and in the transfused WT compared to the WT mice without transfusion, which could be indicative of reactivity of the immune system in response to transfusion.

Keywords: inflammation, alloantibodies, alloimmunization, transfusion, Duchenne muscular dystrophy.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Transfusión sanguínea.

La transfusión sanguínea es un soporte terapéutico para diferentes patologías que tiene como fin reponer los diferentes componentes de la sangre, ya sea, glóbulos rojos, plasma o plaquetas que se encuentran afectados en función y cantidad.

La organización panamericana de salud (OPS) el año 2020 reportó que 10 países, de 34 que suministraron sus datos, realizaron 1.558.637 transfusiones sanguíneas, en donde el componente transfundido con mayor frecuencia fueron los glóbulos rojos, con un 55,37% (27 países informaron haber transfundido más de 2,8 millones de unidades), seguido de las plaquetas con un 12,96% y el plasma fresco congelado con un 10,81% (1). En particular, en Chile existe un registro reportado entre 2016-2017 de 466.602 unidades de glóbulos rojos transfundidos por diversas complicaciones (2).

Sin embargo, las transfusiones sanguíneas no están exentas de problemas, debido a la exposición del paciente receptor, a una gran variedad de antígenos (Ag) que conforman los 44 sistemas sanguíneos descubiertos hasta la fecha (3). Dichos antígenos podrían gatillar una respuesta inmunológica definida como aloinmunización, en la que el sistema inmunitario del paciente reacciona contra Ag eritrocitarios o leucocitarios ajenos, pudiendo causar como consecuencia reacciones hemolíticas (RHT) agudas o tardías (4), así como complicaciones relacionadas al parto como lo es la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EHFRN) (5).

La aloinmunización de glóbulos rojos afecta al 3-10% de los pacientes transfundidos y hasta el 50% de los grupos crónicamente transfundidos (6). Para que exista una aloinmunización no tan solo debe existir una incompatibilidad antigénica entre el donante y el receptor, sino que también esta involucra una serie de factores que dependen de las características de los componentes de los glóbulos rojos a transfundir, así como del estado fisiopatológico del receptor, siendo un factor influyente el estado inflamatorio (7).

En particular, en un estado inflamatorio se ha descrito que aumenta el riesgo de aloinmunización, debido a una sobre activación basal del sistema inmune. Los mediadores proinflamatorios promueven una exacerbada respuesta inmunitaria, que podría favorecer la formación de aloanticuerpos (Alo-Ac) (8). Consecuentemente, es factible suponer que en condiciones patológicas que cursan con inflamación crónica el riesgo a la aloinmunización aumenta.

La investigación que se describe a continuación tuvo como objetivo evaluar si en el contexto de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), una miopatía hereditaria que se manifiesta con inflamación crónica de la musculatura esquelética existe un mayor riesgo a la aloinmunización.

2.2. Inflamación: mecanismos celulares y moleculares involucrados.

La inflamación es una respuesta adaptativa desencadenada por condiciones y estímulos nocivos, como infecciones y lesiones tisulares (9), (10).

El principal causante de una respuesta inflamatoria es el reconocimiento de "señales patogénicas" y/o "señales de daño" por parte del sistema inmunitario (10). La respuesta inmune se desencadena para evitar la diseminación de los patógenos y/o de las señales de daño (10); una de las primeras rutas que acompaña a la respuesta inmune es la activación de la cascada de coagulación y fibrinolítica, así como la deposición plaquetaria, con la finalidad de concentrar al agente inflamatorio únicamente en el tejido afectado (10). Otra importante función de la respuesta inmune es "movilizar" elementos efectores al tejido afectado; estos efectores viajan por la circulación sanguínea y se transloca desde la microvasculatura hasta el tejido dañado. Los distintos componentes celulares y plasmáticos de la inflamación llegan hasta el lugar en el que se encuentra el agente inflamatorio para su destrucción o neutralización (10).

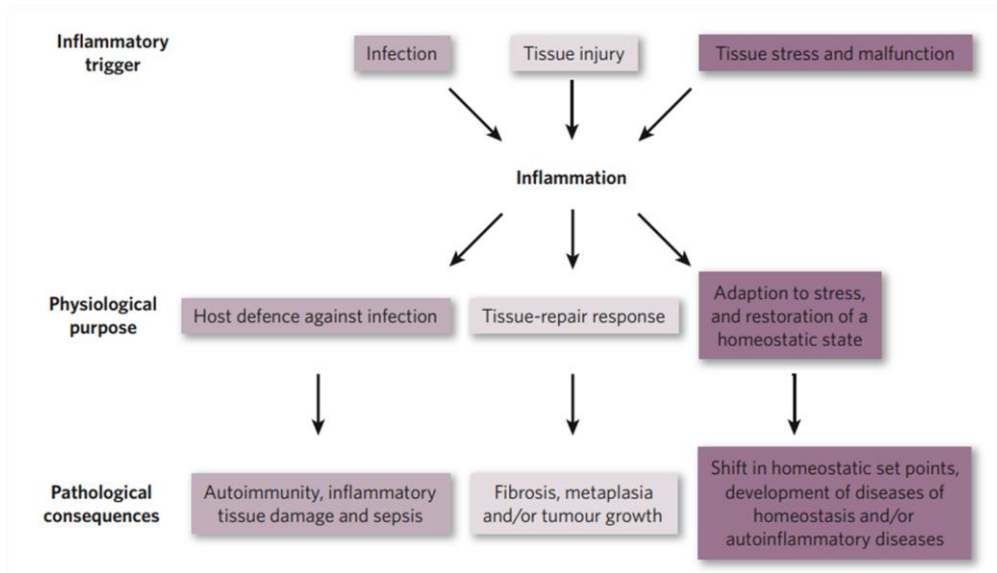


Figura 1: Causas fisiológicas y resultados patológicos, de la inflamación: Dependiendo del factor inflamatorio desencadenante, la respuesta tiene un propósito fisiológico diferente y potenciales consecuencias patológicas. Se han descrito tres factores iniciadores de la inflamación: infección por patógenos, daño tisular y estrés por mala función tisular (10).

La respuesta inflamatoria es gatillada por la presencia de agentes inflamatorios de origen variado (Figura 1); sin embargo, todos estos procesos comparten un mecanismo común, que se puede resumir de la siguiente manera:

- 1) receptores de patrón en las células del sistema inmune innato que reconocen diversos agentes inflamatorios como estímulos dañinos.
- 2) activación de las vías inflamatorias.
- 3) Expresión de mediadores proinflamatorios.
- 4) reclutamiento de células del sistema inmune que exacerban la inflamación (21).

Las células inmunitarias (monocitos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos) liberan mediadores moleculares de la inflamación, las que pueden ser tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, pudiendo promover o inhibir la inflamación, respectivamente.

Estos mediadores modulan la respuesta inmunitaria y la inflamación a través de una compleja red de interacciones, sin embargo, la producción excesiva de citoquinas inflamatorias puede provocar daño tisular, cambios hemodinámicos, insuficiencia orgánica y, en última instancia, la muerte (18). La figura 2 esquematiza una de las rutas inflamatorias más descritas en diversos tejidos, la cual es dependiente de la activación del complejo inflamasoma NLRP3. Esta es una respuesta inflamatoria estandarizada, que promueve la inflamación aguda con la finalidad de eliminar agentes inflamatorios potencialmente dañinos (Figura 2).

NLRP3. Varios DAMPs permiten que la señal 2 active el inflamasoma NLRP3, por ejemplo, cristales, trifosfato de adenosina (ATP) y especies reactivas de oxígeno (11). Al activarse, NLRP3 sufre oligomerización y recluta ASC y procaspasa-1 para formar el complejo inflamasoma NLRP3, el cual procesa a la pro-caspasa-1 para transformarla en su forma activa. La caspasa-1 activada escinde pro-IL-1 β y pro-IL-18 dando lugar a las formas maduras IL-1 β e IL-18, respectivamente, las cuales establecen y perpetúan la inflamación (11).

La respuesta inmune es regulada finamente mediante mecanismos específicos que incluyen la expresión de mediadores pro-resolutivos de la inflamación (SPMs del inglés *specialized pro resolving mediators*) como las resolvinas, maresinas y protectinas que promueven el cambio de fenotipo de los macrófagos involucrados en la respuesta inflamatoria aguda (M1) hacia un fenotipo pro-resolutivo (M2), evitando el daño y deteniendo la respuesta inflamatoria (10). La figura 3 resume los mecanismos más relevantes asociados a la resolución de la inflamación aguda (Figura 3). La respuesta inflamatoria aguda, juega también un rol importante en los mecanismos que conducen a la cicatrización de los tejidos, cuando la inflamación ha sido gatillada por heridas. En tal caso, la inflamación puede acompañarse de daño tisular cuando se vuelve crónica, con pérdida de la función del tejido dañado (9).

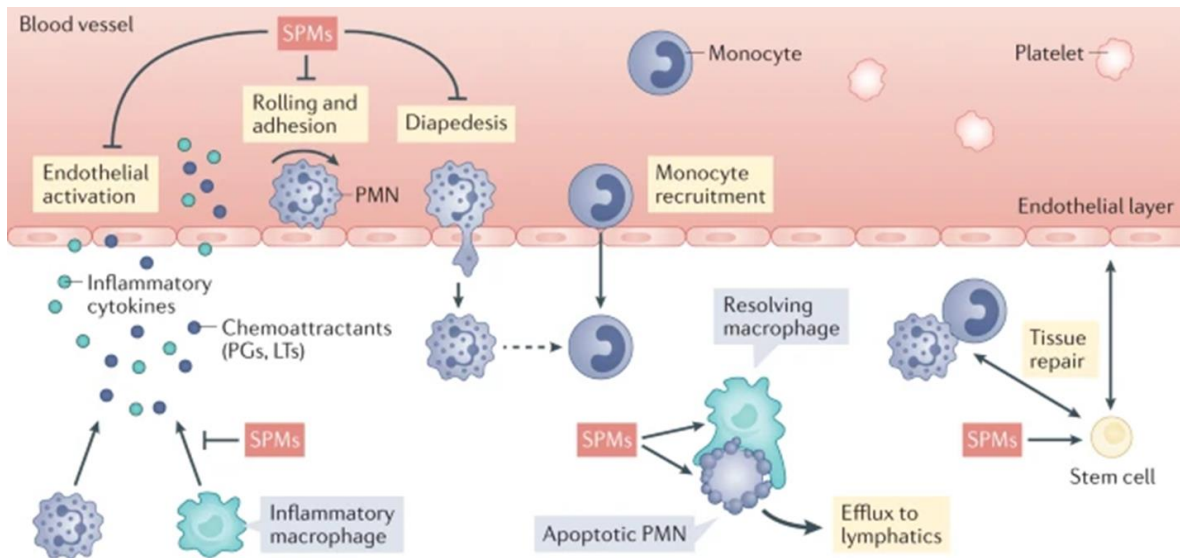


Figura 3: Mecanismos más relevantes asociados a la resolución de la inflamación: Una vez activada la respuesta inmune asociada a la inflamación aguda, se activan mecanismos específicos para resolver la inflamación, evitando potenciales efectos deletéreos. Los mediadores moleculares de la resolución son los SPMs (del inglés *specialized pro resolving mediators*). Estos se sintetizan a partir de ácidos grasos insaturados de la serie omega 3 como el EPA y DHA. Los SPMs producidos en el sitio de la lesión tisular median sus efectos a través de interacciones entre las células endoteliales y/o epiteliales residentes y las células polimorfonucleares (PMN) infiltrantes. Los SPM ejercen sus acciones a través de la interacción con receptores específicos acoplados a proteínas G expresados en las células residentes del tejido y PMNs. Las reacciones mediadas por los SPMs que promueven la resolución incluyen la atenuación de la activación de las células endoteliales, el bloqueo de la extravasación de los neutrófilos, la promoción del reclutamiento de monocitos, la promoción de un cambio de fenotipo de macrófagos desde uno proinflamatorio (M1) hacia uno pro-resolutivo (M2), la estimulación de la apoptosis de neutrófilos y la esferocitosis de los macrófagos. Las SPMs son producidas por células madre y actúan sobre ellas, y la evidencia sugiere que las SPM median los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de estas células. PG, prostaglandinas; LT, leucotrienos (30).

La inflamación es un mecanismo de defensa vital. Los eventos e interacciones celulares y moleculares que se ejecutan durante la respuesta inflamatoria minimizan de manera eficiente lesiones o infecciones en los tejidos. Cuando este objetivo se cumple, procesos resolutivos, con mediadores celulares y moleculares específicos contribuyen a la restauración de la homeostasis tisular y a la resolución de la inflamación aguda (21). Sin embargo, la inflamación aguda desregulada puede volverse crónica, contribuyendo a la progresión de una variedad de enfermedades (21).

2.3 Aloinmunización.

La transfusión sanguínea es un soporte en el tratamiento de diferentes patologías, sin embargo, uno de los principales problemas de la transfusión es la aloinmunización o la respuesta inmune contra antígenos eritrocitarios o leucocitarios del donante, la cual es responsable de reacciones hemolíticas transfusionales (RHT) agudas o tardías, complicaciones en el embarazo como la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EHFRN) (8), (12).

Debido a la gran cantidad de antígenos eritrocitarios, al polimorfismo de algunos sistemas y el gran número de epítopes en cada antígeno, cada transfusión de glóbulos rojos (GR) introduce una gran cantidad de aloantígenos que tienen la capacidad de producir respuesta inmunológica en el receptor, la cual puede culminar en la producción de aloanticuerpos (Alo-Ac) que se asocian con riesgo de morbilidad y la necesidad de transfundir unidades fenotipadas en las transfusiones siguientes (12).

La prevalencia de aloinmunización reportada para la población general de pacientes es del 1 al 1,5%, (13), sin embargo, en pacientes politransfundidos la prevalencia es variable según las patologías de base, la población y el diseño del estudio. En pacientes con anemia de células falciformes se han reportado prevalencias de aloinmunización del 19 al 50%, (14), (15) en pacientes onco-hematológicos se han reportado prevalencias del 15% (específicamente en pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemia

mielomonocítica crónica) (16) y en pacientes con β talasemia la prevalencia reportada va desde el 3 hasta un 37% (17).

Se han propuesto varios factores que podrían estar asociados con aloinmunización, por un lado, está el hecho de que cada paciente tiene un conjunto único de genes y cursa con un estado clínico particular asociado a sus patologías. Por otro lado, están las variables asociadas con las características propias de las unidades de sangre, que dependen de la genética y estado fisiológico del donante, además del procesamiento y las conocidas lesiones de almacenamiento que sufren las unidades de GR (12). Sin embargo, no se ha establecido un posible marcador molecular que permita predecir el riesgo de desarrollar Alo-Ac y no existe suficiente evidencia de los mecanismos por los cuales estos factores contribuyen con el fenómeno (12). Los factores de que influyen en la aloinmunización:

2.3.1. Características de los componentes sanguíneos:

Se ha propuesto que las características de los componentes sanguíneos pueden tener efectos inmunomoduladores en el receptor. Durante su almacenamiento en los bancos de sangre, los GR sufren una serie de cambios físicos y bioquímicos denominados "lesiones de almacenamiento" que pueden disminuir la vida media del GR y/o que pueden dar lugar a "señales de peligro" capaces de activar una respuesta inmunológica en el receptor. También se ha planteado que la presencia de leucocitos viables en las unidades de transfusión y sus mediadores, pueden contribuir con señales inflamatorias de peligro (12).

2.3.2. Disparidad fenotipo donante – receptor:

La disparidad en el fenotipo donante-receptor es el factor de riesgo mejor descrito para aloinmunización y es atribuido a las diferencias genéticas existentes entre los Antígenos eritrocitarios más frecuentes en la población (dependiendo de la etnia) y a los niveles de expresión diferencial de estos (8). Algunos estudios reportan que la prevalencia de aloinmunización en pacientes con anemia de células falciformes disminuye cuando se

introducen protocolos de transfusión de unidades fenotipadas desde el diagnóstico o cuando la compatibilización se realiza con donantes de la misma etnia (18).

Debido a que la prevalencia de aloinmunización en la población general de pacientes es baja, las estrategias de transfusión de unidades fenotipadas se enfocan en los pacientes diagnosticados con patologías dependientes de transfusión o en los pacientes que dependen de terapia transfusional y a los cuales se les han identificado Alo-Ac.

2.3.3. Número de transfusiones versus número de unidades:

El número de unidades transfundidas también ha sido estudiado como un factor que contribuye en el fenómeno de aloinmunización. En pacientes no aloinmunizados el riesgo de formar aloanticuerpos aumenta en un 6,5% a partir de la unidad 40, sin diferencias significativas entre género y edad, este riesgo es independiente de la cantidad de los aloanticuerpos que pueden generar los individuos politransfundidos, (13) a su vez no se han encontrado diferencias significativas con protocolos de transfusión masiva (19). Otros estudios sin embargo proponen que el riesgo está relacionado con el número de transfusiones y no con la cantidad de unidades (18).

2.3.4. Factores inmunológicos:

La formación de Alo-Ac es producto de la presentación eficiente de epítopes de Ag eritrocitarios y de la generación de memoria inmunológica, responsable de responder de forma más robusta frente a un nuevo contacto con el Ag (18). El proceso de aloinmunización a los eritrocitos del donante implica varios pasos, los que incluyen: el reconocimiento de antígenos en los eritrocitos por parte del sistema inmune receptor; el procesamiento y la presentación del antígeno por el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) de clase II a los linfocitos T vía el receptor de linfocitos T (TCR); la activación de células T auxiliares CD4+; la interacción de las células T y B y, finalmente, la diferenciación de las células B en células plasmáticas (figura 4).

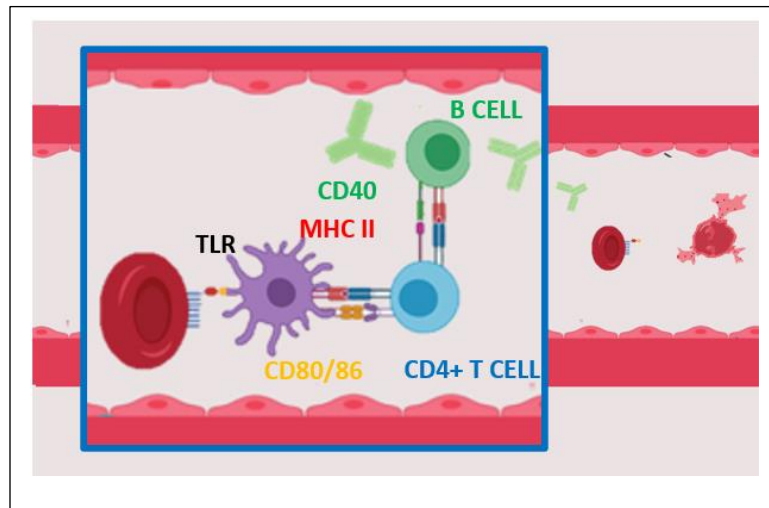


Figura 4: Esquema de la presentación antigénica que gatilla la producción de aloanticuerpos : Una vez que es reconocido el antígeno extraño en el eritrocito, por parte de la célula presentadora de antígeno, esta procesa y presenta el antígeno por el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) de clase II a los linfocitos-T vía el receptor de linfocitos T (TCR); a continuación las células T auxiliares CD4+ activadas interactúan con células B y promueve su diferenciación en células plasmáticas que generan aloanticuerpos, los cuales podrán reaccionar contra una segunda exposición (20).

2.4. Aloinmunización por transfusión de glóbulos rojos en un estado inflamatorio.

Los estudios en humanos y en modelos murinos han demostrado que el proceso de aloinmunización contra los antígenos eritrocitarios se puede modular a través de factores genéticos y adquiridos, aunque la relevancia de estos factores no se ha dilucidado por completo. Las diferencias antigénicas entre los GR del donante y del receptor son un requisito para el desencadenante inicial de la aloinmunización (8).

El estado inflamatorio que caracteriza a diversas patologías crónicas ha sido planteado como un posible factor de riesgo que incrementa la posibilidad de aloinmunización, esto debido a una sobre activación basal del sistema inmune innato y adaptativo (7). En estados inflamatorios crónicos el incremento en las concentraciones de citoquinas proinflamatorias promueve una exacerbada respuesta inmunitaria, lo que podría favorecer la formación de Alo-Ac o respuestas inmunológicas robustas cuando el paciente ya tiene antecedentes de aloinmunización (21).

En modelos animales se ha observado que el estado inflamatorio puede modificar un estado “no respondedor” a uno “respondedor” frente a transfusiones. También se ha planteado que la exposición previa a estructuras análogas a Ag eritrocitarios puede predisponer a la respuesta inmunológica frente a GR alogénicos (8).

Los modelos desarrollados son:

- **Ratones mHEL:** Estos son ratones transgénicos que expresan un transgén para una forma unida a membrana de la proteína lisozima de clara de huevo de gallina (mHEL del inglés *membrane bound hen egg lysozyme*). Al la cual se expresa en eritrocitos, leucocitos, plaquetas y tejidos generando una respuesta inmunológica ante su transfusión (22).
- **Ratones HOD:** Estos ratones expresan una proteína de triple fusión restringida a los glóbulos rojos codificadas por tres transgenes: lisozima de clara de huevo de gallina (HEL), ovoalbúmina (OVA) y el grupo sanguíneo humano Duffy,), la que permite el uso de diversas herramientas de carácter que dirige s expresión exclusivamente en GRs (22).
- **Ratones hGPA:** Este modelo transgénico expresa clones cromosomales artificiales de bacterias, las cuales contienen regiones promotoras para el gen hGPA (glicoforina A humana) gatillando hiperreactividad eritrocitaria (22).

En estos modelos murinos, se ha demostrado que ciertos estímulos proinflamatorios favorecen la aloinmunización, muy probablemente debido al consumo adicional de glóbulos rojos transfundidos por las células dendríticas (DC) esplénicas y hepáticas, que

son potentes inductores de aloinmunización (8), (22). La observación reciente de que una reacción febril previa a la transfusión se asocia con un mayor riesgo de aloinmunización respalda aún más el papel de la inflamación como un factor que promueve la aloinmunización (18). Lo anterior sugiere fuertemente que en contextos en los que la inflamación crónica contribuye a la fisiopatología de una determinada enfermedad, el riesgo a sufrir aloinmunización aumenta.

Dentro de las condiciones patológicas en las que se ha descrito inflamación crónica tejido específica y sistémica se encuentra la Distrofia muscular de Duchenne.

2.5. Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

La DMD es una miopatía hereditaria que se clasifica dentro del espectro de "enfermedades raras" o poco frecuentes. La DMD es la miopatía hereditaria humana más prevalente y el tipo más devastador de distrofia muscular. Sus signos clínicos incluyen mialgia, hipotonía, hipotrofia, pérdida de masa muscular y pérdida temprana de movilidad independiente (23). La DMD es causada por mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X en el gen que codifica a la distrofina, una proteína que proporciona estabilidad estructural e integridad a la membrana de las miofibras o sarcolema (23). Las mutaciones en distrofina causan ausencia de esta proteína, comprometiendo la integridad del sarcolema durante el proceso contráctil, lo que favorece la infiltración masiva de células inmunitarias y la consecuente inflamación crónica (figura 5), necrosis y degeneración muscular severa (24). Aunque las mutaciones de distrofina representan la principal causa de DMD, son los procesos secundarios que involucran inflamación crónica los que probablemente exacerban los signos clínicos de la enfermedad y contribuyen a la atrofia muscular (24), (22). Hasta la fecha no existen reportes que demuestren si esta condición predispone a los pacientes con DMD a un mayor o menor riesgo de aloinmunización por transfusiones sanguíneas de glóbulos rojos, por lo que es un punto de potencial relevancia en el área de la medicina transfusional.

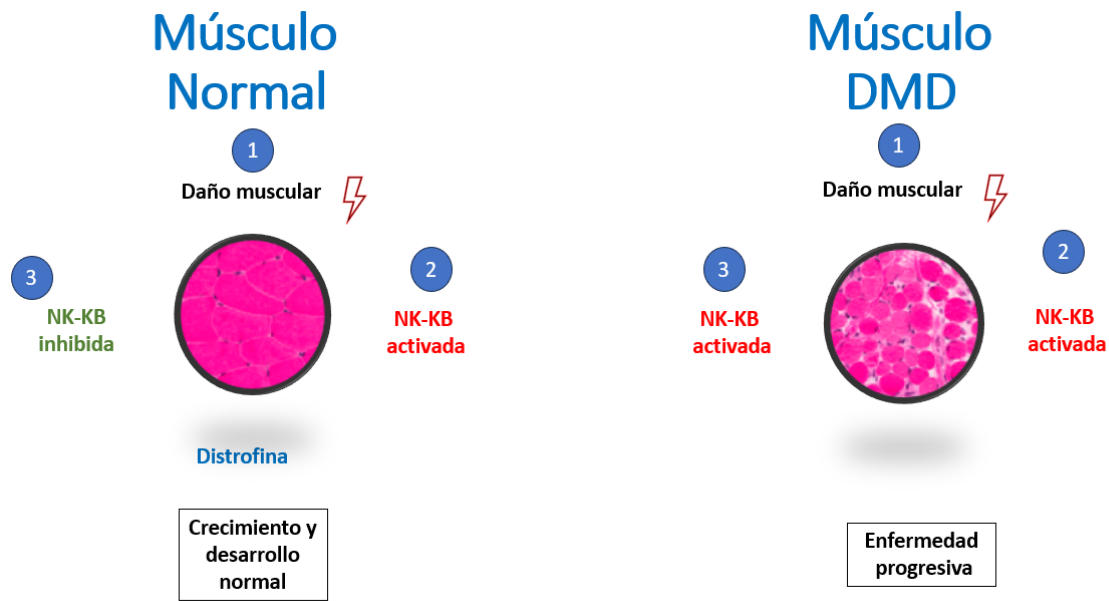


Figura 5: Esquema del rol de la inflamación crónica en los signos clínicos de la Distrofia muscular de Duchenne: La imagen de la izquierda muestra que, en condiciones normales, las fibras musculares esqueléticas cuentan con la proteína distrofina expresada en el sarcolema la cual conecta el citoesqueleto de la fibra con la matriz extracelular y “protege” el sarcolema de las “microlesiones” gatilladas por el proceso contráctil. Por lo tanto, las cascadas inflamatorias que se gatillan por estas lesiones (mediadas por el factor nuclear NF-κB) se resuelven sin dificultad. La imagen de la derecha muestra que, en el contexto de la distrofia muscular de Duchenne, las fibras musculares esqueléticas carecen de distrofina por lo que las “microlesiones” gatilladas por el proceso contráctil se perpetúan, haciendo que las cascadas inflamatorias que se gatillan en respuesta a las lesiones (mediadas por el factor nuclear NF-κB) no se puedan resolver, conduciendo a un estado inflamatorio crónico en el músculo esquelético.

Con esto en mente, el objetivo del presente trabajo de tesis fue responder si es que en el contexto inflamatorio crónico que contribuye a la atrofia muscular progresiva en la DMD aumenta el riesgo de aloinmunización. Para abordar esta pregunta de investigación utilizamos ratones *mdxcv4*, modelo murino de la DMD como sujeto experimental y su contraparte silvestre (wildtype, WT) como control, los cuales fueron sometidos a transfusión de glóbulos rojos desde un ratón donante sano de la cepa C57BL/6 para evaluar el riesgo a aloinmunización.

La pregunta de investigación que se abordó a lo largo de este trabajo de tesis fue:

¿La inflamación crónica aumenta el riesgo de aloinmunización en ratones *mdxcv4*, modelo murino de Distrofia Muscular de Duchenne?

3. HIPÓTESIS

“El estado inflamatorio crónico favorece la aloinmunización luego de la transfusión de glóbulos rojos en ratones *mdxcv4*, modelo murino de Distrofia Muscular de Duchenne”.

4. OBJETIVO GENERAL (OG)

Evaluar la relación entre marcadores inflamatorios y el riesgo de aloinmunización por transfusión de glóbulos envejecidos rojos en ratones *mdxcv4*, modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

OE1. Comparar los niveles de la citoquina proinflamatoria IL6 y de la citoquina antiinflamatoria IL10 en el plasma de ratones *mdxcv4* y su contraparte wild type (WT) sometidos a transfusión de glóbulos rojos envejecidos.

OE2. Estimar la razón de linfocitos-T efectores/regulatorios presentes en el plasma de ratones *mdxcv4* y su contraparte WT sometidos a transfusión de glóbulos rojos envejecidos.

OE3. Evaluar la producción de aloanticuerpos en el plasma de ratones *mdxcv4* y su contraparte WT sometidos a transfusión de glóbulos rojos envejecidos.

OE4. Evaluar la existencia de hemólisis en muestras plasmáticas de ratones *mdxcv4* y su contraparte WT sometidos a transfusión de glóbulos rojos envejecidos.

OE5. Comparar características morfológicas y porcentaje de esplenomegalia en ratones *mdxcv4* sometidos a transfusión de glóbulos rojos.

6. METODOLOGÍA

6.1. Metodología general:

Para el desarrollo de los objetivos planteados en esta tesis se utilizaron ratones *mdxcv4* modelo murino de Distrofia Muscular de Duchenne (cepa *C57BL/6 mdx4cv*) y sus hermanos de camada silvestre (WT wildtype) y heterocigotos (HTZ) como control. Este corresponde a un ratón transgénico que expresa una mutación en el gen DMD que codifica para la proteína distrofina. Los ratones *mdxcv4* se encuentran entre los modelos de ratones DMD más utilizados (43). Los ratones *mdxcv4* homocigotos para la mutación suprimen la expresión de la proteína y exhiben signos claros de distrofia muscular a partir de los 2 meses de edad; los ratones heterocigotos para la mutación expresan un fenotipo menos severo (25). Se utilizaron animales de al menos 2 meses, edad a la cual los animales ya expresan signos de distrofia e inflamación músculo esquelético (25).

Los ratones donantes fueron machos sanos de la cepa (*C57BL/6*) de entre 2-6 meses de edad. Los animales fueron mantenidos en el bioterio institucional de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso en racks ventilados, cajas con un número máximo de 4 animales cada una, agua y comida *ad libitum*, temperatura de 22+/-1 °C y ciclos constantes de luz/oscuridad de 12/12 horas. Los protocolos utilizados en esta investigación fueron evaluados y aprobados por el Comité institucional para el cuidado de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias de la UV (Acta de Aprobación CBC-38/2022).

Los ratones fueron transfundidos dos veces con 150 µl de glóbulos rojos diluidos en 500 µl de solución salina tamponada (PBS 1X, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) a través de la vena lateral de la cola. El intervalo entre transfusiones fue de una semana. Finalmente, al término de la segunda semana se extrajo sangre de los ratones transfundidos por punción cardíaca para la medición de los parámetros mencionados en los objetivos específicos

6.2. Diseño experimental:

Los ratones donantes de sangre se anestesiaron con isoflurano 3% y luego se extrajo mediante punción cardiaca aproximadamente 1ml de sangre total (se utilizó como anticoagulante CPD, Citrato, Fosfato dextrosa), la cual fue centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. Luego se retiró todo el plasma y el concentrado de glóbulos rojos fue lavado una vez con PBS para retirar los leucocitos y plaquetas que pudieran quedar. La centrifugación de lavado de GR consistió en mezclar PBS con los GR y luego centrifugar a 2000 rpm por 2 min, luego se retiró el sobrenadante y los GR restantes se conservaron con SAGM (solución salina-adenina-glucosa-manitol) hasta por 42 días a 4°C.

Cabe señalar que para, mantener la esterilidad, los mesones fueron limpiados con cloro 0,5 % y alcohol 70%. La zona donde se realizó la punción cardiaca fue desinfectada con alcohol 70% previo al procedimiento.

El acto transfusional también se llevó a cabo con los ratones receptores anestesiados con isoflurano 3%, administrado por una cámara de anestesia.

Los ratones receptores de transfusión fueron machos o hembras (HTZ) de entre 2-6 meses de edad, según la disponibilidad de ratones de la cepa modelo en estudio. Una vez anestesiados, se inmovilizaron con un tubo cilíndrico hasta la visualización de la vena lateral de la cola, previa aplicación de compresas tibias. Una vez ubicada la vena de la cola, se transfundió en forma lenta con jeringas de tuberculina 150 µl de sangre diluida con 500 µl de PBS.

Una vez realizada la transfusión, los ratones se devolvieron a su caja hasta que se despertaron completamente.

Este acto transfusional se repitió una semana después para luego, al término de la segunda semana, realizar extracción de sangre de aproximadamente 1 mL de todos los ratones transfundidos y no transfundidos mediante punción cardiaca. La sangre extraída fue conservada en tubos pediátricos con anticoagulante EDTA para los análisis presentados en los objetivos específicos (26) (28).

Los grupos experimentales utilizados en esta Tesis, correspondientes a los ratones receptores de transfusión, fueron seis:

- WT de 2 meses de edad sin transfusión
- *mdxcv4* heterocigotos (HTZ) de 2 meses de edad sin transfusión
- *mdxcv4* homocigotos (HMZ) de 2 meses de edad sin transfusión
- WT de 2 meses de edad transfundidos con GR leucorreducidos.
- *mdxcv4* HTZ de 2 meses de edad transfundidos con GR leucorreducidos.
- *mdxcv4* HMZ de 2 meses de edad transfundidos con GR leucorreducidos.

La figura 6 esquematiza el diseño experimental aplicado en este estudio.

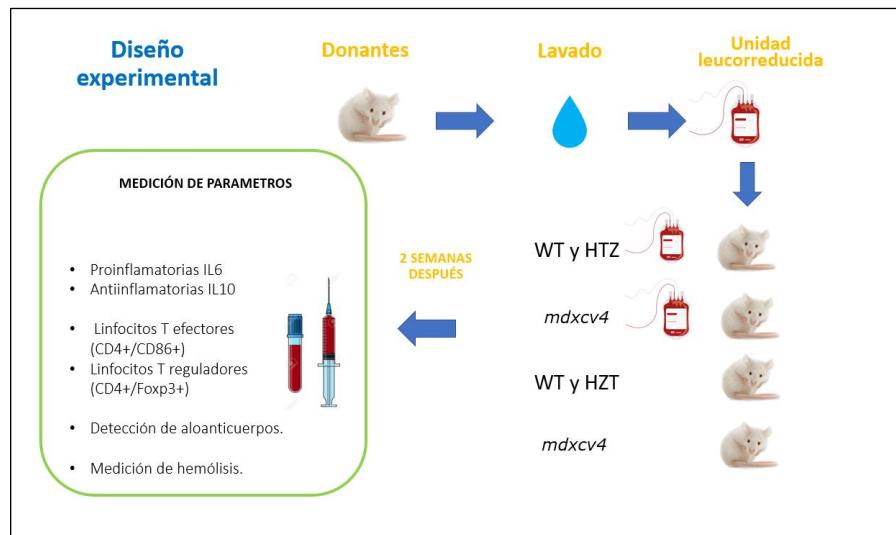


Figura 6: Esquema del diseño experimental: Se extrajo sangre por punción cardíaca a partir de ratones donantes, los GR fueron concentrados, lavados para Leucorreducción y almacenados a 4°C hasta su uso, por hasta 42 días. Los ratones receptores de los distintos grupos experimentales fueron transfundidos 2 veces por la vena lateral de la cola (transfusiones separadas por una

semana) luego se extrajo de ellos sangre por punción cardíaca para aislar plasma. Los ratones fueron sacrificados por decapitación y se extrajo de ellos el bazo para estudios histológicos.

6.3. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de IL6 y IL10 (OE1).

Para abordar el objetivo 1 se utilizó un ensayo de inmuno-absorción ligada a enzimas (ELISA) para la medición cuantitativa de marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios de los ratones en el plasma, utilizando un kit comercial (IL-6 Mouse ELISA Kit - Invitrogen (thermofisher.com) IL-10 Mouse ELISA Kit - Invitrogen (thermofisher.com) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, en este ensayo se emplearon pocillos que estaban recubiertos anticuerpos específicos para los marcadores de interés (IL-6 y IL-10) en una placa de 96 pocillos. Los estándares y las muestras se pipetearon en los pocillos y el marcador presente en una muestra se unió a los pocillos mediante el anticuerpo inmovilizado. Los pocillos se lavaron y se añadió el anticuerpo dirigido contra el marcador de interés, conjugado a biotina. Después de lavar el anticuerpo biotinilado no unido se agregó estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a los pocillos. Los pocillos se lavaron de nuevo y un sustrato de la HRP (TMB) se añadió a los pocillos y se desarrolló un producto coloreado de la reacción, en proporción a la cantidad del marcador unido. Se detuvo la reacción con una solución "stop" y la solución cambió el color de azul a amarillo; se midió absorbancia a 450 nm, la cual fue proporcional a la concentración del marcador de interés en la muestra. Se confeccionó la curva de calibración realizando 7 diluciones del vial estándar que contiene el Kit Thermo Fisher para cada marcador de interés (Anexo 1).

6.4. Citometría de flujo para la detección de poblaciones de linfocitos T efectores (CD4+/CD86+) y linfocitos T reguladores (CD4+/Foxp3+) (OE2).

Para abordar el objetivo 2, se cuantifico las cantidades relativas de linfocitos T efectores y T reguladores (razón T efector/T regulador) en el plasma de ratones *mdxcv4* Y WT mediante citometría de flujo (BD Accuri C6), tal como se describe a continuación. Los linfocitos presentes en el plasma fueron “rescatados” previa centrifugación a 300 rpm por 5 min. Se lavaron las células y se ajustó la suspensión celular a una concentración de $1-5 \times 10^6$ células / ml en PBS frío (4°C). Las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente. Se añadió el anticuerpo primario y posteriormente se incubó durante al menos 30 minutos en la oscuridad a 4 °C. Se lavaron las células 3 veces por centrifugación y se resuspendieron en PBS frío. La dilución de utilizada fue a 1/1000 (0,5 en 500). Se mantuvo las células en oscuridad sobre hielo hasta la hora programada para el análisis. Por último, se analizaron las células en el citómetro de flujo. Si el anticuerpo primario no estaba fusionado a un fluoróforo, se necesitó un anticuerpo secundario, repitiendo el procedimiento (Tabla 1) (27). Si la muestra no se ocupó de inmediato los linfocitos se fijaron en para-formaldehído (PFA) al 4% y se conservaron a 4°C hasta la correspondiente medición. La tabla 1 describe los anticuerpos utilizados en este ensayo. Para el marcaje de la población linfocitaria se usó un anticuerpo dirigido contra CD4 conjugado con el fluoróforo isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Ex 498 nm/Em 517 nm) detectable por el filtro FL1 del citómetro, para el marcaje específico de los linfocitos reguladores , previamente permeabilización, se usó un anticuerpo dirigido contra FOXP3 conjugado con e-Fluor 660 (Ex 633 nm/Em 669 nm) detectable por el filtro FL4 y para el marcaje específico de los linfocitos efectores se usó un anticuerpo dirigido contra CD86 seguido por un anticuerpo secundario conjugado con Cyanina3 (Cy3) (Ex 554 nm/ Em 566 nm) el cual fue detectado por el filtro FL2.

Cabe señalar que los anticuerpos fueron elegidos ya que:

FOXP3: es un factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de las células T reguladoras CD4⁺ humanas y murinas. FOXP3 ha sido definido por diversos autores como el “gen maestro” controlador del desarrollo y función de las células reguladoras y es considerado el principal marcador molecular de esta subpoblación reguladora (44).

CD4: Funciona como correceptor para la activación de células T restringidas a MHC-II, es un marcador de diferenciación tímica para todas las células T (44).

CD86: Es una proteína expresada constitutivamente en células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos, células B y otras células presentadoras de antígenos. Junto con CD80, CD86 proporciona señales coestimuladoras necesarias para la activación y supervivencia de las células T (45).

Marca	CD	Origen	Fluoróforo	Anticuerpo Secundario	Fluoróforo
Thermofisher	CD4+	Rata	FITC	X	X
Neobiotechnologies	CD86+	Conejo	X	Anti-conejo	Cy3
Marca	Anticuerpo	Origen	Fluoróforo	Anticuerpo Secundario	Fluoróforo
Thermofisher	FOXP3+	Ratón	eFluor 660	X	X

Tabla 1: Anticuerpos monoclonales utilizados para la detección de linfocitos T efectores y T reguladores murinos.

6.5 Detección de aloanticuerpos en sangre murina (OE3).

Para la detección de aloanticuerpos se realizó un ensayo de aglutinación en columnas de gel (DG Gel Neutral Grifols). En primer lugar, se realizó una dilución al 1% con PBS de una alícuota de los glóbulos rojos que se transfundieron a los ratones. De esta dilución se dispensó 50 µl en cada pocillo de gel para 17 determinaciones. Sobre cada pocillo se dispensó 25 µl de plasma de cada ratón, para luego incubar durante 15 minutos a 37°C en un incubador digital para tarjetas (DG Therm). Transcurrido este tiempo se adicionó 25 µl de inmunoglobulina IgG anti-ratón de conejo (DAKO) y nuevamente se incubó durante 15 minutos a 37°C. Terminado este tiempo, la tarjeta se centrifugó durante 10 minutos a 900rpm (DG Spin Grifols). Para la validación de la técnica se utilizó el mismo procedimiento con glóbulos rojos humanos y antiglobulina humana, control positivo y negativo con glóbulos rojos sensibilizados con IgG y no sensibilizados, respectivamente. Finalmente se evaluó por inspección visual la existencia y el grado de aglutinación por toda la columna de gel, indicador de la presencia de aloanticuerpos (8) (variable cualitativa).

6.6. Cuantificación de hemólisis (OE4).

Para cuantificar el porcentaje de hemólisis se utilizó dos técnicas por separado. Por un lado, una vez extraída la muestra de sangre total con anticoagulante EDTA, se mezcló y se tomó una muestra con una cubeta para ser medido a través de un analizador de hemoglobina total Hbt (CompoLab TM Fresenius kabi) utilizando un sensor multicromático de amplio espectro, que mide la absorbancia de la sangre completa sobre un rango espectral amplio. Las cubetas no contienen ningún reactivo. La exactitud de la medición de la hemoglobina depende de la longitud de la trayectoria de la luz a través de la muestra en el interior de la cubeta, combinada con el principio de medición del analizador. El sistema cuenta con una calibración interna (realizada mediante el método de la cianometahemoglobina, el método de referencia internacional para la cuantificación de hemoglobina). El resultado aparece en la pantalla con unidades g/dl. Luego se centrifugó la muestra a 3500 rpm por 5 minutos, para tomar en otra cubeta el plasma

que fue medido para la cuantificación de la hemoglobina libre con el analizador HemoCue® Plasma/Low Hb System. Este consiste en un fotómetro y una microcubeta diseñados especialmente para la determinación cuantitativa de bajas concentraciones de hemoglobina libre HbL en muestras de plasma y suero. El principio se basa en el Método azidametahemoglobina modificada; longitudes de onda duales (570 nm y 880 nm) para compensar la turbidez. El resultado aparece en la pantalla con unidades g/dl.

Teniendo los resultados de Hb total y Hb libre se calculó el % de hemólisis a través de la siguiente fórmula (*In vitro* hemolysis assay protocol Hemocue).

Hematocrito (Hto)= HbT X 2,941

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{HbL} \times (1 - \text{Hto}) \times 100}{\text{HbT}}$$

6.7 Análisis de los bazos mediante tinción con hematoxilina/eosina (OE5).

Una vez extraída la sangre por punción cardiaca, se procedió a sacrificar a los ratones y a retirar su bazo a través de la apertura de la pared abdominal en forma aséptica, ubicado al lado izquierdo del ratón. Los bazos extraídos fueron pesados y posteriormente depositados en PFA 4% y se almacenaron a 4° C hasta su procedimiento. Los bazos fijados fueron teñidos con la tinción de hematoxilina/eosina (H&E) para visualización general de la micro-anatomía del órgano. La H&E tiñe con precisión los componentes nucleares, incluidos la heterocromatina y los nucléolos de color azulado, mientras que la eosina tiñe los componentes citoplasmáticos, como el colágeno y las fibras elásticas, las fibras musculares y los glóbulos rojos con un color rojizo. En una H&E de alta calidad, existen diferencias sutiles en los tonos de color producidos por las tinciones, especialmente la eosina, y esto ayuda a la detección e interpretación de los cambios morfológicos asociados con diversos contextos fisiopatológicos.

6.8. Análisis estadístico

Se utilizó GraphPad Prism 9.5.1 y Microsoft Excel para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio. Se analizó si los datos se distribuían paramétrica o no paramétricamente, mediante una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se realizó una prueba ANOVA de múltiples variables para comparar todas las condiciones experimentales y un t-student para comparar pares de condiciones. Los datos se presentaron en gráficos como media $\pm$ SEM, considerándose como significativo un valor de $p < 0.05$.

6.9. Consideraciones bioéticas.

Los protocolos para utilizar fueron sometidos a evaluación por el Comité institucional para el cuidado de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias de la UV. (Anexo 1)

Presentado 05 de abril 2022

Aprobación 28 de junio 2022 ACTA DE APROBACION CBC-38/2022.

7. RESULTADOS

7.1. Producción de citoquinas inflamatoria IL6 y antiinflamatoria IL10 en ratones *mdxcv4* sometidos a transfusión de glóbulos rojos.

Para analizar si existían diferencias en el estado inflamatorio de los ratones *mdxcv4* (homocigotos y heterocigotos) y los WT que fueron utilizados como receptores de transfusión se midieron los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL6 y de la citoquina anti-inflamatoria IL10. Luego de ser sometidos a dos actos transfusionales, separados cada uno por una semana, los ratones receptores de transfusión, *mdxcv4* homocigotos para la mutación en distrofina (HMZ), heterocigotos (HTZ) y su contraparte *wildtype* (WT) fueron sometidos a extracción de sangre por punción cardiaca y sacrificados por decapitación. La sangre fue centrifugada para la separación de glóbulos rojos y plasma.

La figura 7A muestra la concentración promedio de IL6 en el plasma de los ratones transfundidos o sin transfundir. Tal como se observa en la gráfica, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Particularmente, y en contra de lo que se esperaba por los antecedentes previamente reportados (29)(31), los ratones *mdxcv4* HMZ sin transfundir no mostraron diferencias con los ratones WT en los niveles de IL6 plasmática, ni antes ni después de las transfusiones (Figura 7A). Interesantemente, los ratones HTZ-para la mutación en distrofina que fueron transfundidos mostraron un aumento evidente (aunque no estadísticamente significativo) en los niveles de IL6 en comparación con los ratones WT transfundidos y sin transfundir (Figura 7A).

La figura 7B muestra la concentración promedio de IL10 en el plasma de los ratones transfundidos o sin transfundir. Tal como se observa en la gráfica, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales para esta citoquina anti-inflamatoria. No obstante, es importante notar que los ratones HMZ mostraron niveles menores de IL10 en comparación a los WT antes de la transfusión. La transfusión aumentó los niveles plasmáticos de IL10 tanto en los ratones WT como en los HMZ (Figura 7B), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

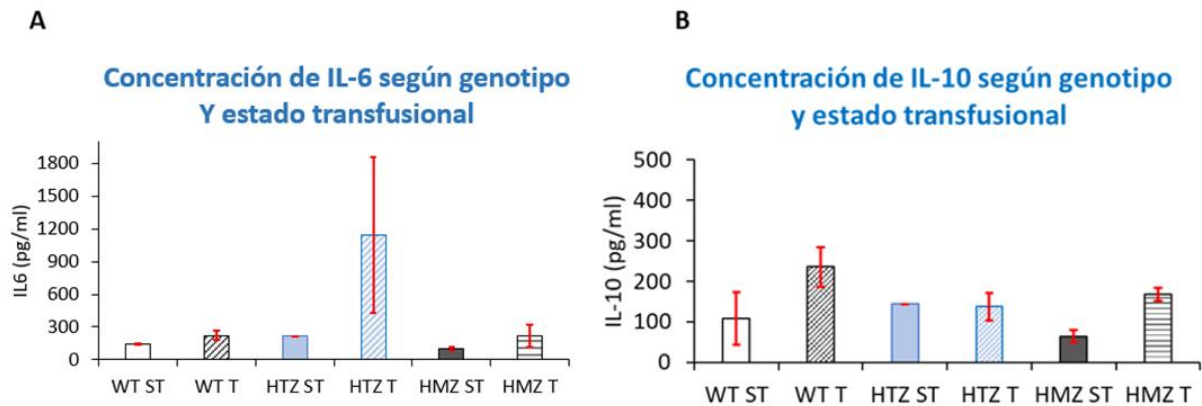


Figura 7. Efecto de la transfusión de glóbulos rojos sobre los niveles de IL6 e IL10 en plasma de ratones *mdxcv4*, modelo de DMD: Luego de dos actos transfusionales separados por una semana, los ratones *mdxcv4* homocigotos (HMZ), heterocigotos (HTZ) y su contraparte wildtype (WT) fueron sometidos a extracción de sangre por punción cardiaca y sacrificados por decapitación. La sangre fue centrifugada para la separación de glóbulos rojos y plasma. **(A)** Los niveles de IL 6 y de **(B)** IL10 fueron cuantificados mediante ELISA. La absorbancia de los productos de la reacción colorimétrica fue medida a 450 nm en un lector de placas. Los resultados muestran la concentración promedio de IL6 (A) e IL10 (B). Los resultados se muestran como el promedio $\pm$ SEM. Los datos se distribuyeron paramétricamente y se analizaron con el test ANOVA. Los datos no mostraron diferencias estadísticas ($p=0,1750$). N= 2 WT-ST (WT sin transfundir), 5 WT-T (WT transfundidos), 1 HTZ-ST (HTZ sin transfundir), 3 HTZ T (HTZ transfundidos), 2 HMZ ST (HMZ sin transfundir), 4 HMZ T (HMZ transfundidos).

7.2. Estimación de la razón de linfocitos-T efectores/reguladores en ratones *mdxcv4* sometidos a transfusión de glóbulos rojos.

Para estimar diferencias en la respuesta inmunológica a la transfusión entre los ratones *mdxcv4* (homocigotos y heterocigotos) y WT se intentó cuantificar la población de linfocitos T-efectores y de los linfocitos T-reguladores desde la sangre de los ratones sometidos a transfusión. Paralelamente, se extrajo sangre de un ratón WT sin transfusión (que no formaba parte de los grupos experimentales del estudio) como control. La sangre extraída por punción cardíaca fue sometida a centrifugación para aislar la fase enriquecida en células blancas, la cual fue resuspendida en PBS, fijada en PFA 4% y analizada para la expresión de marcadores de las poblaciones linfocitarias de interés. Específicamente, se utilizó anticuerpos contra CD4 para el marcaje de linfocitos T, CD86, para el marcaje de linfocitos efectores y FOXP3 para el marcaje de linfocitos reguladores. Las células CD4+/CD86+ se identificaron como linfocitos T-efectores y las células CD4+/FOXP3+ se identificaron como linfocitos T-reguladores. Debido a que en el proceso de centrifugación se rescataron muy pocas células linfocitarias, no fue posible realizar este análisis para las muestras de todos los animales usados en el estudio. La figura 8 muestra gráficas representativas de los perfiles celulares que pudieron ser analizados, a partir de: la muestra del ratón WT control sin transfundir (8A), una muestra de uno de los ratones del grupo experimental WT transfundido (8B) y una muestra de uno de los ratones del grupo experimental *mdxcv4* (HMZ) transfundido (8C). En la muestra del ratón WT sin transfundir aproximadamente un 42% de las células correspondían a linfocitos murinos (Figura 8A, arriba). La mayoría de estas células presentó marcaje positivo para CD86+/Foxp3+ (población Q2), pero esto no representa una célula en particular sino se superponen los marcadores por problemas en la compensación fluorescente. Una pequeña proporción de estas células siendo sólo positivas para CD86 y negativa para Foxp3 (población Q1), (Figura 7A, arriba). En la muestra del ratón WT transfundido (Figura 7B, arriba) se observó una población linfocitaria mucho menor que en (A), con solo un 10.6% de las células presentes en la muestra siendo compatibles con la población de linfocitos T. De estas células, un porcentaje mayoritario es CD86+/Foxp3+ (Q2), pero esto no representa una célula en particular sino se superponen los marcadores por problemas en la compensación

fluorescente. seguido de una población $CD86^{+}/Foxp3^{-}$ (Q1) y de una población (Q3) $Foxp3^{+}/CD86^{-}$ (Figura 8B, abajo). En la muestra del ratón HMZ transfundido (Figura 8C, arriba) también se observó una población linfocitaria de menor proporción que la del WT control. De estas células, un porcentaje mayoritario fue positiva para $CD86$ y $Foxp3^{+}$ (Q2), pero esto no representa una célula en particular sino se superponen los marcadores por problemas en la compensación fluorescente por la poca cantidad de células que no pudimos ver los fluoróforo por separado, seguido de una pequeña población positiva para $CD86^{+}$ y negativa para $Foxp3^{-}$ (Q1) y de una pequeña población (Q3) $Foxp3^{+}/CD86^{-}$ (Figura 8C, abajo).

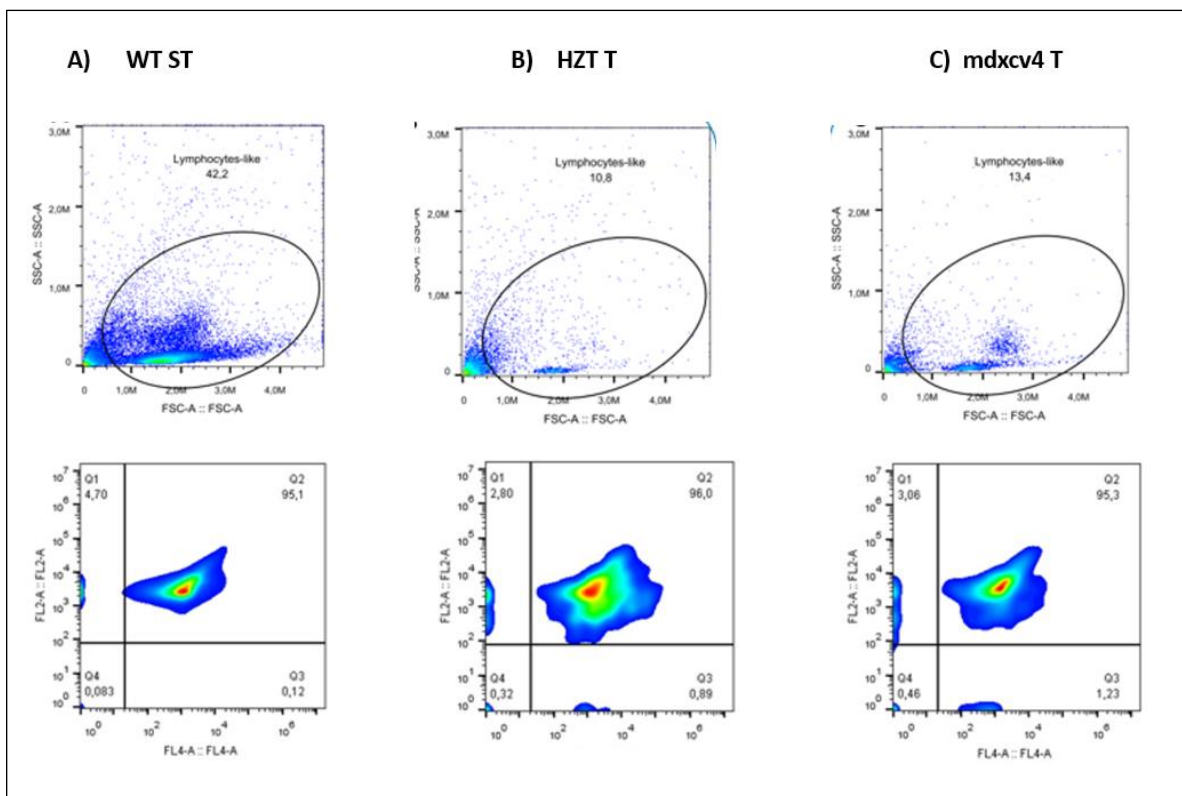


Figura 8. Estimación de la población de linfocitos Tefectores/Treguladores desde sangre de ratones mdxcv4 sometidos a transfusión de glóbulos rojos. Luego de dos actos transfusionales separados por una semana, los ratones *mdxcv4* HMZ, HTZ y los ratones WT receptores de transfusión fueron sometidos a extracción de sangre por punción cardiaca y sacrificados por decapitación. Paralelamente, se extrajo sangre de un ratón WT sin transfusión (que no formaba parte de los grupos experimentales del estudio) como control. La sangre fue centrifugada para la separación de glóbulos rojos, células blancas y plasma. La fracción correspondiente a células blancas fue fijada en PFA 4% e inmunomarcada con anticuerpos específicos contra CD4, CD86 y FOXP3. **(A)** En la muestra del ratón WT sin transfundir se observó aproximadamente un 42% de “eventos” que presentaban morfología y tamaño esperado para linfocitos murinos (arriba). El gráfico inferior muestra que la mayoría de estas células es CD86+/Foxp3+ (Q2) pero esto no representa una célula en particular sino se superponen los marcadores por problemas en la compensación fluorescente. Y una pequeña proporción de estas células es CD86+/Foxp3- (Q1). **(B)** En la muestra del ratón WT transfundido (gráfica superior) se observó una población linfocitaria mucho menor que en (A), con solo un 10.6% de las células presentes en la muestra exhibiendo el tamaño y la morfología esperada. El gráfico inferior muestra que, de estas células, un porcentaje mayoritario es CD86+/Foxp3+ (Q2) pero esto no representa una célula en particular sino se superponen los marcadores por problemas en la compensación, seguido de una pequeña población CD86⁺/Foxp3⁻ (Q1) y de una pequeña población Foxp3⁺/CD86⁻ (Q3). **(C)** En la muestra del ratón HMZ transfundido (gráfica superior) se observó una población linfocitaria similar a la de la muestra en (B). El gráfico inferior muestra que, de estas células, un porcentaje mayoritario es CD86+/Foxp3+ (Q2) pero esto no representa una célula en particular sino se superponen los marcadores por problemas en la compensación, seguido de una pequeña población CD86⁺/Foxp3⁻ (Q1) y de una pequeña población Foxp3⁺/CD86⁻ (Q3).

7.3. Estimación de la generación de aloanticuerpos en ratones mdxcv4 sometidos a transfusión de glóbulos rojos.

Para evaluar la presencia de aloanticuerpos, como un indicador de aloinmunización, en ratones sometidos a transfusión de glóbulos rojos se utilizó un ensayo de aglutinación en columna en gel. Se incubó el plasma de cada ratón de los grupos experimentales del estudio con alícuotas de los mismos glóbulos rojos que le fueron (o no) transfundidos, con el fin de evidenciar si existían anticuerpos de tipo IgG capaces de reaccionar con los antígenos de dichos glóbulos rojos. De existir aloanticuerpos en las muestras estudiadas, estas debieron aglutinarse, formando agregados incapaces de atravesar el gel, quedando retenidos a lo largo de la columna. Si no existían los aloanticuerpos en las muestras, estas serían capaces de atravesar fácilmente el gel llegando al fondo de la columna. Como se observa en la figura 9 no se evidenció aglutinación para ninguna de las muestras analizadas, lo que sugiere que las dos transfusiones que recibieron los ratones WT, HTZ y HMZ no fueron una señal suficiente para generar aloanticuerpos contra los glóbulos rojos del ratón donante.

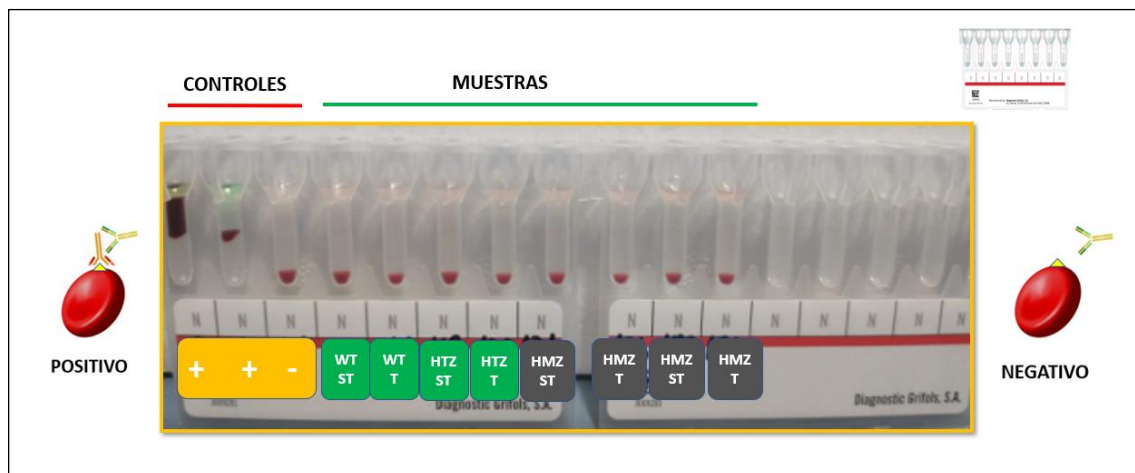


Figura 9. Efecto de la transfusión de glóbulos rojos sobre la generación de aloanticuerpos en plasma de ratones mdxcv4, modelo de DMD: Luego de dos transfusiones separadas cada una por un tramo de una semana, los ratones HMZ, HTZ y WT receptores de

transfusión fueron sometidos a extracción de sangre por punción cardiaca y sacrificados por decapitación. La sangre fue centrifugada para separar glóbulos rojos de plasma. El plasma se incubó con alícuotas de los mismos glóbulos rojos que fueron transfundidos y luego fueron “sembrados” en una columna en gel cebada con inmunoglobulina de ratón. Las muestras en las que existían aloanticuerpos formaron agregados incapaces de atravesar el gel, quedando retenidos a lo largo de la columna. Si no se formaron aloanticuerpos, la muestra eluyó sin dificultad, quedando al final del tubo de la columna en gel. Para validar la técnica se realizaron controles (lado izquierdo) positivo y negativo con glóbulos rojos humanos y antiglobulina humana. En la imagen, desde la cuarta columna hacia la derecha se identifican los diferentes grupos experimentales. No se evidenció aglutinación (aloanticuerpos) para ninguna de las condiciones experimentales. N= 2 WT-ST (WT sin transfundir), 5 WT-T (WT transfundidos), 1 HTZ-ST (HTZ sin transfundir), 3 HTZ T (HTZ transfundidos), 2 HMZ ST (HMZ sin transfundir), 4 HMZ T (HMZ transfundidos).

7.4. Estimación de hemólisis en ratones mdxcv4 sometidos a transfusión de glóbulos rojos.

La hemólisis es la destrucción de glóbulos rojos, la cual conlleva a la liberación de su contenido, incluyendo hemoglobina. La presencia de aloanticuerpos que reconocen antígenos en la superficie de los glóbulos rojos, puede gatillar una reacción de reconocimiento antígeno/anticuerpo, conduciendo a la destrucción de los glóbulos rojos con anticuerpos adheridos en su superficie, al pasar por el bazo (20). Para evaluar si en respuesta a la transfusión los glóbulos rojos del modelo de DMD exhiben hemólisis, se midió la liberación de hemoglobina desde los glóbulos rojos de los ratones sometidos a los actos transfusionales. La concentración de hemoglobina liberada se midió a través de dos analizadores: CompoLab TM para medir la hemoglobina total (HbT) y HemoCue® Plasma/Low Hb System para obtener la hemoglobina libre (HbL). A partir de estos datos se calculó el porcentaje de hemólisis aplicando la siguiente fórmula:

Hematocrito (Hto)= HbT X 2,941

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{HbL} \times (1 - \text{Hto}) \times 100}{\text{HbT}}$$

Tal como se muestra en la figura 10 no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de hemólisis promedio entre ninguna de las condiciones experimentales. Los ratones HTZ sin transfundir mostraron una tendencia a un mayor porcentaje de hemólisis que los ratones WT sin transfundir. Contra lo esperado, la transfusión no indujo hemólisis en ninguno de los grupos experimentales (Figura 10).

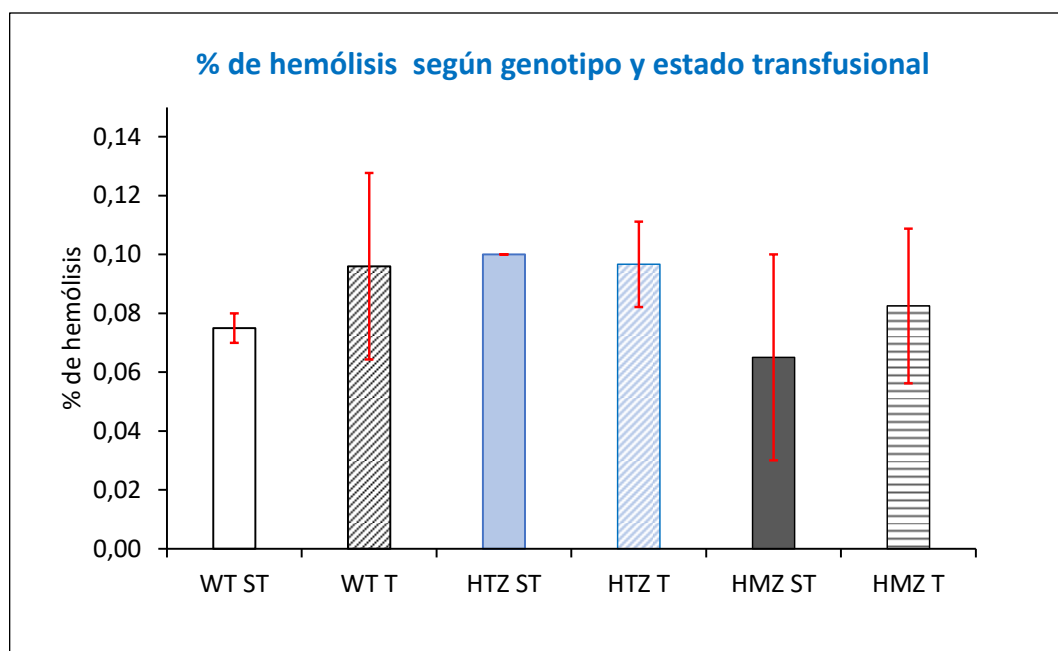


Figura 10. Efecto de la transfusión de glóbulos rojos sobre el porcentaje de hemólisis en el plasma de ratones *mdxcv4*, modelo de DMD: Luego de dos semanas de la primera transfusión, los ratones fueron sometidos a extracción de sangre por punción cardíaca y se separó el plasma de los glóbulos rojos mediante centrifugación. El plasma fue procesado para la medición de hemoglobina total (HbT) utilizando un analizador CompoLab TM, y de hemoglobina libre utilizando un analizador HemoCue® Plasma/Low Hb System. El porcentaje de hemólisis se calculó con la fórmula $\% \text{ de hemólisis} = \text{HbL} \times (1 - \text{Hto}) \times 100 / \text{HbT}$, donde Hto(hematocrito)= $\text{HbT} \times 2,941$. N= 2 WT-ST (WT sin transfundir), 5 WT-T (WT transfundidos), 1 HTZ-ST (HTZ sin transfundir), 3 HTZ T (HTZ transfundidos), 2 HMZ ST (HMZ sin transfundir), 4 HMZ T (HMZ transfundidos).

7.5. Características morfológicas y porcentaje de esplenomegalia en ratones mdxcv4 sometidos a transfusión de glóbulos rojos.

Finalmente, se realizó un análisis de los bazo, para evaluar posibles signos de una respuesta inmune desbalanceada y/o destrucción de glóbulos rojos en los ratones transfundidos. Luego de la extracción de sangre por punción cardíaca, los ratones fueron sacrificados. Se limpió con alcohol la zona abdominal y se extrajo el bazo en condiciones de asepsia. Los bazos aislados fueron pesados, para analizar el grado de esplenomegalia (aumento del volumen del bazo, indicativo de una respuesta inmune exacerbada). Posteriormente los bazos fueron fijados con PFA al 4% y teñidos con la tinción de hematoxilina/eosina (H&E) para un análisis microscópico de la estructura del tejido.

La figura 11 muestra el porcentaje de esplenomegalia de los ratones en comparación a los ratones WT sin transfundir. Todas las condiciones analizadas muestran un aumento cercano al 35% de la masa del bazo respecto a la condición control (Figura 11). Los bazos WT transfundidos, así como los bazos de los ratones mdxcv4 modelo de DMD (transfundidos y sin transfundir) mostraron un mayor porcentaje de esplenomegalia que los ratones WT que no fueron sometidos a transfusión. Lamentablemente, no fue posible cuantificar el bazo de ratones HMZ sin transfundir, ya que, se priorizó que esto pocos ratones fueran transfundidos para aumentar el número de HMZ Transfundidos.

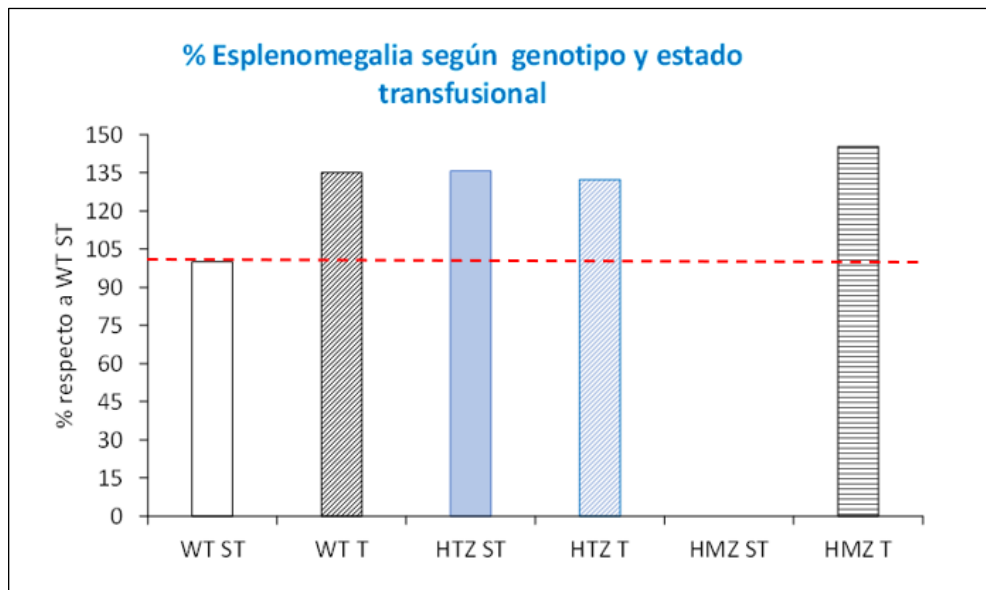


Figura 11. Porcentaje de esplenomegalia de ratones WT y *mdxcv4* modelo de DMD: Los bazo de ratones WT y *mdxcv4* HTZ y HMZ transfundidos o sin transfundir fueron extraídos mediante incisión en la zona abdominal y pesados como un indicador de su masa y volumen. Se calculó un porcentaje de esplenomegalia, normalizando el peso de los bazo por el peso del bazo del ratón WT sin transfundir y multiplicando x100%. Lo bazo obtenidos fueron N= 1 ratones WTST, 4 ratones WTT (WT transfundidos), 1 ratones HTZST, 2 ratones HTZT, 0 ratones HMZ ST, 2 ratones HMZ T (HMZ transfundidos). Las barras representan el promedio $37,00 \pm 11,39$ % (*p=0,0117), observados significancia en el porcentaje de esplenomegalia con respecto a los WT ST.

Los bazo luego de ser pesados fueron fijados, teñidos con H&E y visualizados por microscopía de campo claro. En un análisis preliminar se visualizó el bazo de un ratón WTST, un ratón HTZT y un ratón HMZT (Figura 12). El bazo WTST exhibió una cápsula conectiva contenida por una estructura vascular, evidente pulpa blanca y pulpa roja (Figura 12A). Cabe mencionar que la pulpa blanca del bazo es una estructura constituida por una vaina linfóide periarteriolar y un nódulo linfóide secundario excéntricamente ubicado (32). En la pulpa roja del bazo WTST se pueden distinguir espacios vasculares irregulares, al parecer de senos venosos y los cordones de Billroth más normales. En la pulpa blanca se observan linfocitos sin presencia de polimorfonucleares. En el bazo de los ratones HTZ y HMZ transfundido se evidenció las mismas estructuras que en WTST, aunque destaca una pulpa roja más amplia con igual distribución de linfocitos y sin presencia de polimorfonucleares (Figura 12B-C).

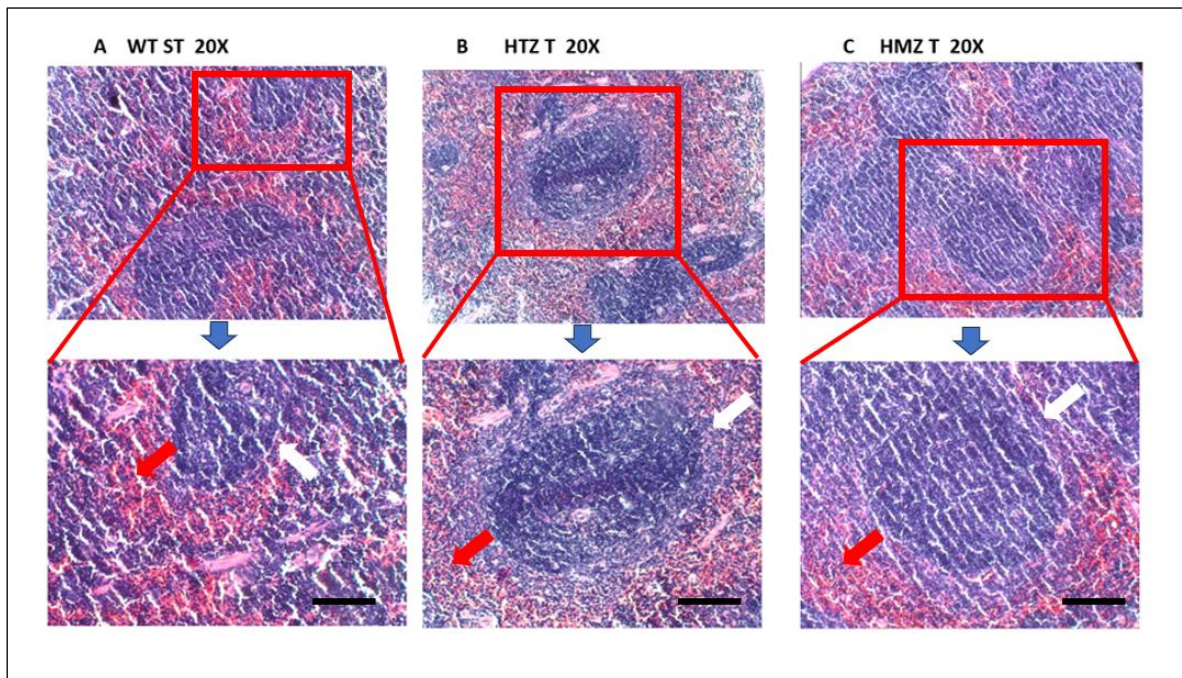


Figura 12. Comparación histológica del bazo de ratones WT y mdxcv4 HTZ y HMZ, modelo de DMD: Los bazos fueron extraídos desde la cavidad abdominal, limpiados con PBS, fijados con PFA 4% y teñidos con la tinción de H&E. **(A)** En el bazo WTST se observa una cápsula conectiva contenida por una estructura vascular, evidente pulpa blanca (flecha blanca) y pulpa roja (Flecha roja). En la pulpa roja se pueden distinguir espacios vasculares irregulares. En la pulpa blanca se observan linfocitos sin presencia de polimorfonucleares. (B-C) En el bazo de los ratones HTZT (B) y HMZT (C) se evidencian las mismas estructuras que en WT ST, aunque destaca una pulpa roja más amplia, con igual distribución de linfocitos y sin presencia de polimorfonucleares en la pulpa blanca. Barra de escala=100 μ m.

8. DISCUSIÓN.

En medicina transfusional el acto de transfusión de componentes sanguíneos está fundamentado en la recuperación de las funciones y cantidad de elementos sanguíneos perdidos por el paciente, con el fin único de recuperar su condición de salud. Sin embargo, este tratamiento terapéutico no está exento de problemas que pueden gatillar una reacción adversa en respuesta a los componentes a los cuales está siendo sometido. Estas reacciones dependen, en parte, de las características de los componentes sanguíneos que están siendo transfundidos, aunque hasta la fecha no se ha descrito un único patrón que pueda explicar la producción de anticuerpos en respuesta a la exposición de un antígeno distinto a los propios.

La respuesta gatillada frente a antígenos ajenos es conocida como aloinmunización. Se ha demostrado que, en contextos inflamatorios, en los que la respuesta inmune de un receptor se encuentra desbalanceada, existe mayor riesgo de sufrir aloinmunización en respuesta a un acto transfusional (8).

Con esto en consideración, el objetivo de este trabajo de Tesis fue investigar si es que, en el contexto patológico de una inflamación crónica, el riesgo de aloinmunización aumenta. Específicamente se evaluó en un modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne (DMD), una miopatía hereditaria que cursa con inflamación crónica (24), si es que existía mayor probabilidad de aloinmunización en respuesta a la transfusión de glóbulos rojos.

A diferencia de otros estudios previos en ratones, en los que se indujo inflamación mediante modelos de infección bacteriana para evaluar aloinmunización (8), en esta tesis se evaluó si es que la inflamación crónica en el contexto de la DMD constituía un factor de riesgo de aloinmunización. Esto último debido a que es menos probable que en ratones singénicos (con el mismo background genético) ocurran reacciones de aloinmunización. En este estudio, se analizó la expresión de aloanticuerpos contra potenciales antígenos eritrocitarios que pudieran aparecer debido al daño que se produce por el almacenamiento de los glóbulos rojos, el cual ha sido descrito que puede generar

alteraciones en la membrana superficial del glóbulo rojo almacenado, exponiendo “neoantígenos” (33).

Dadas las condiciones experimentales en las que se desarrolló este estudio, el riesgo de una reacción adversa a la transfusión fue mínimo. No obstante, los ratones *mdxcv4* modelo de DMD presentan una inflamación crónica musculoesquelética y sistémica significativa, según los antecedentes previamente reportados (34), por lo que era factible esperar un aumento en el riesgo a la aloinmunización. Sin embargo, la colonia de ratones *mdxcv4* con la que se llevó a cabo esta tesis no presentó signos de inflamación sistémica, no observándose diferencias significativas en los niveles plasmáticos de la citoquina proinflamatoria IL6, ni en los niveles plasmáticos de la citoquina antiinflamatoria IL10 en comparación a los ratones WT control (Figura 7).

Aunque los ratones *mdxcv4* HTZ o HMZ mutantes de distrofina no evidenciaron signos de inflamación sistémica dependiente de IL6 en este estudio, existe evidencia de que IL6 está aumentada en el contexto de la DMD y que, según lo reportado por Pelosi y colaboradores (2015), la inhibición de IL-6 en ratones mdx, tiene un efecto beneficioso en los signos de distrofia (46).

Una posibilidad es que otras interleuquinas proinflamatorias o antiinflamatorias se vean afectadas en el modelo murino de DMD. En este sentido hay estudios que demuestran que existe un aumento de IL-1 β en los músculos y en el suero de individuos con DMD, respaldando la hipótesis de que esta citocina contribuye a la inflamación en esta distrofia (46).

La interleucina-17, una clase de citocinas proinflamatorias producidas por células T también parece aumentar en el contexto de la DMD. El estudio de Pasquale y colaboradores (2012) demostró que los músculos de pacientes distróficos tienen altos niveles de ARNm y de proteína de IL-17, mientras que, en músculos de individuos saludables esta citoquina es indetectable(47).

Otro componente importante en el proceso inflamatorio es el TNF- α , una citocina proinflamatoria que gatilla y estimula la respuesta inmune durante procesos inflamatorios agudos y crónicos. En tejido muscular se ha demostrado que TNF α

aumenta en respuesta a microlesiones musculares, siendo liberado por neutrófilos, macrófagos y linfocitos que se acumulan rápidamente en el sitio de la lesión (47). Se ha demostrado que las concentraciones séricas de TNF- α aumentan notablemente en el modelo mdx en comparación con ratones control, y también en pacientes con DMD, en los que la concentración de TNF- α se sugiere como un posible “marcador de gravedad” de la enfermedad (48)

En el presente estudio, no se evidenciaron diferencias en el perfil de citoquinas IL6/IL10 en respuesta a dos actos transfusionales. Una posibilidad cierta es que los glóbulos rojos utilizados para la transfusión no presentaron la inmunogenicidad necesaria como para producir una respuesta inmune. En estudios previos, en los que se evaluó el efecto de la inflamación sobre el riesgo a aloinmunización en ratones, esto se realizó en ratones inducidos con lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (8) o con poli: I:C (8) un par de horas antes de la transfusión, “obligando” al sistema inmunológico de los ratones a gatillar una cascada inflamatoria aguda; en tales casos la probabilidad de aloinmunización aumentó de manera significativa (8)(35)(36).

La inflamación es frecuentemente un elemento clave en la progresión de diversas patologías. Una cascada inflamatoria ampliamente reconocida es aquella mediada por el factor nuclear NF- κ B, la cual puede dar lugar a la sobre expresión de diversos mediadores moleculares de la inflamación como son el inflamasoma NLRP3 y los efectores de sus señalizaciones incluyendo caspasa-1, y las citoquinas proinflamatorias IL1 β e IL18 (11). En el contexto de la DMD, la inflamación crónica sistémica y musculoesquelética involucra un aumento en la expresión de NLRP3 (24) (37), por lo que es probable que sea esta una vía más relevante que pudiera contribuir a un mayor riesgo a aloinmunización. En este sentido, es necesario evaluar si hay cambios en la expresión de estos mediadores en respuesta a la transfusión en ratones *mdxcv4*, antes de descartar aloinmunización. De todos modos, es importante notar que algunos estudios sugieren que el inflamasoma NLRP3 no es imprescindible para que ocurra el proceso de aloinmunización en respuesta a la transfusión de glóbulos rojos en ratones (38).

La ausencia de un “contexto inflamatorio de base” en los ratones *mdxcv4*, impidió evaluar si es que realmente la inflamación crónica en la DMD aumenta el riesgo a aloinmunización. De hecho, no fue posible evidenciar formación de aloanticuerpos en el plasma de los ratones transfundidos (Figura 9) mediante la técnica de aglutinación. Según reportes previos, durante la segunda semana de haber recibido la primera transfusión, los ratones debieron exhibir “sensibilización” (8), mostrando una respuesta inflamatoria evidente en respuesta a la segunda transfusión. Esto no ocurrió y una posibilidad es que los glóbulos rojos transfundidos no presentaban antígenos inmunogénicos o que la cantidad de glóbulos rojos transfundidos fue insuficiente para gatillar esta respuesta. De hecho, tampoco se observó evidencia de hemólisis en ninguna de las muestras analizadas (Figura 10), lo cual es congruente con la nula generación de aloanticuerpos en las condiciones en las que se desarrolló este estudio.

Para analizar si la transfusión tenía algún impacto en la activación del sistema inmune en los ratones *mdxcv4* se intentó estimar la razón de linfocitos-T efectores/reguladores mediante citometría de flujo. Existe evidencia de que el número de linfocitos-T circulantes aumenta en el músculo y en la sangre periférica de pacientes con DMD (39), no obstante, el subtipo de linfocitos afectados es variable y depende del tipo de mutación en el gen de distrofina que porte el paciente (40). En este estudio la cantidad de linfocitos presentes en las muestras analizadas por citometría de flujo fue muy bajo, insuficiente para evaluar si existían cambios en la población de linfocitos-T reguladores (CD4+/FOXP3+) o efectores (CD4+/CD86+) y si estos eran influenciados por el genotipo de los ratones o en respuesta al acto transfusional (Figura 8). El bajo recuento linfocitario en nuestras muestras se pudo deber al tiempo que estuvieron almacenados previo a la medición (más de 14 días) a pesar de que fueron fijados; de hecho, el plasma proveniente de un ratón WT usado como control en este estudio, el cual estuvo también fijado, pero por menos de una semana preservó de mejor forma los linfocitos presentes en la muestra, mostrando un número mayor de linfocitos totales que los observados en los ratones transfundidos (Figura 8A). Considerando que existe evidencia en la literatura de un cambio en los linfocitos circulantes y en su infiltración en el tejido muscular en el contexto de la DMD, este es un aspecto interesante para seguir abordando, con miras a potenciales intervenciones terapéuticas. Debido a la inflamación que se describe en

pacientes y en modelos animales de DMD, la activación de la respuesta inmune innata ha sido la más estudiada en esta patología, no obstante, el sistema inmune adaptativo, incluyendo linfocitos-T y eventualmente linfocitos-B generadores de anticuerpos, podrían ser un blanco terapéutico interesante de abordar en el futuro. De hecho, evidencia reciente sugiere que los ratones *mdxcv4* presentan defectos estructurales y funcionales en el timo, un órgano clave para la maduración linfocitaria (41), lo que sin duda podría influenciar la progresión de la patología y el desarrollo de respuestas inmunológicas desbalanceadas, por ejemplo, favoreciendo aloinmunización frente a actos transfusionales.

El bazo, otro órgano linfoide clave para la respuesta inmunológica, también parece verse afectado en el contexto de la DMD. Un estudio reciente demostró que los ratones *mdxcv4* muestran importantes alteraciones en la arquitectura del bazo, así como deficiencia de múltiples proteínas críticas para su metabolismo (42), lo que sugiere que existe un desbalance en la “conversación” entre el sistema linfoide y el músculo distrófico, lo que puede exacerbar la sintomatología de esta enfermedad. En esta tesis se realizó un análisis preliminar de los bazos de algunos de los ratones WT y *mdxcv4* sometidos a transfusión, evidenciándose aproximadamente un 35% de esplenomegalia en los ratones HTZ y HMZ modelo de Duchenne, en comparación con el bazo del ratón WT sin transfundir (Figura 11). Al analizar la arquitectura de los cortes histológicos de los bazos teñidos con H&E, no fueron evidentes cambios estructurales, aunque se logró distinguir una zona más amplia de la pulpa roja del bazo de los ratones *mdxcv4* en comparación al bazo WTST (Figura 12 C). Cabe destacar que la pulpa roja constituye la mayor parte del tejido estromal del bazo. Esta está formada por los cordones de Billroth y las sinusoides esplénicas. Los cordones de Billroth (cordones esplénicos) son las agregaciones celulares que están sostenidas por el tejido conectivo reticular. Su estructura está organizada en columnas a las que se adhieren macrófagos, plasmocitos y glóbulos rojos. Este es, sin duda, un aspecto interesante de este estudio en el que se debe profundizar con miras a entender de mejor manera como se afecta el sistema inmune en el contexto de la DMD y cómo esto puede gatillar respuestas exacerbadas ante eventos clínicos como una transfusión, modificando el riesgo a la aloinmunización.

A través de este estudio se pretendió aportar en el entendimiento de la fisiopatología de la DMD y de cómo la inflamación crónica descrita en esta patología podría influenciar la susceptibilidad a aloinmunización. Sin embargo, la colonia de ratones *mdxcv4*, HTZ y HMZ para la mutación en el gen de distrofina utilizados en este estudio, no presentaron cambios en los niveles plasmáticos de IL6 o IL10 en comparación a los ratones WT, sugiriendo ausencia de inflamación crónica. En estudios futuros, y dada la naturaleza singénica de los ratones *mdxcv4* y los donantes de la cepa C57BL/6, una alternativa experimental será evaluar susceptibilidad a aloinmunización en ratones *mdxcv4* utilizando como donantes de sangre cepas de ratón transgénicos que expongan antígenos más inmunogénicos.

Aun cuando los resultados de esta Tesis no permiten hacer conclusiones certeras, el continuar con esta investigación podría ser relevante en el futuro, en pos de tener mayor claridad sobre el adecuado manejo clínico de los pacientes con DMD que deben enfrentar transfusiones sanguíneas. y podría sentar las bases para estudios similares en otros contextos patológicos inflamatorios.

9. CONCLUSIONES

- La colonia de ratones *mdxcv4*, heterocigotos (HTZ) y homocigotos (HMZ) para la mutación en el gen de distrofina utilizados en este estudio, no presentan cambios en los niveles plasmáticos de IL6 o IL10 en comparación a los ratones WT.
- El número de linfocitos rescatados del plasma de ratones HMZ, HTZ y WT no fue suficiente para analizar cambios en la población de linfocitos T efectores y T reguladores entre los grupos experimentales.
- Los ratones *mdxcv4* utilizados en este estudio no presentan susceptibilidad a aloinmunización por transfusión de glóbulos rojos, ni evidencian hemólisis en comparación a los ratones WT.
- Los ratones *mdxcv4* utilizados en este estudio exhiben un porcentaje de esplenomegalia cercano al 35% en comparación con los ratones WT control.
- En las condiciones en las que se realizó este estudio no existe en los ratones *mdxcv4* un estado inflamatorio de base que influencie el riesgo a aloinmunización frente a la transfusión de glóbulos rojos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Suministro de sangre para transfusión en países de América Latina y el Caribe (2020*) - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 30 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/sangre/suministro-sangre-para-transfusion-paises-america-latina-caribe-2020>
2. Suministro de sangre para transfusiones en los países de América Latina y el Caribe 2016-2017 [Internet]. Organización Panamericana de la Salud; 2020 [citado 30 de junio de 2023]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52150>
3. ISBT. 202 table of blood group antigens within systems [Internet]. [citado 1 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupantigenswithinsystems.html>
4. Suddock JT, Crookston KP. Transfusion Reactions. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 1 de julio de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482202/>
5. Pandey P, Kumari S, Mandal S, Sawhney A, Jain R. A case of severe hemolytic disease of newborn due to alloimmunization in primigravida. Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang. febrero de 2023;30(1):5-7.
6. Soldatenko A, Hoyt LR, Xu L, Calabro S, Lewis SM, Gallman AE, et al. Innate and Adaptive Immunity to Transfused Allogeneic RBCs in Mice Requires MyD88. J Immunol Baltim Md 1950. 15 de febrero de 2022;208(4):991-7.
7. Garraud O, Tariket S, Sut C, Haddad A, Aloui C, Chakroun T, et al. Transfusion as an Inflammation Hit: Knowns and Unknowns. Front Immunol [Internet]. 2016 [citado 1 de julio de 2023];7. Disponible <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00534>

8. Hendrickson JE, Desmarests M, Deshpande SS, Chadwick TE, Hillyer CD, Roback JD, et al. Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion (Paris)*. septiembre de 2006;46(9):1526-36.
9. Hannoodde S, Nasuruddin DN. Acute Inflammatory Response. En: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2022 [citado 1 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>
10. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 24 de julio de 2008;454(7203):428-35.
11. Mulay SR. Multifactorial functions of the inflammasome component NLRP3 in pathogenesis of chronic kidney diseases. *Kidney Int*. julio de 2019;96(1):58-66.
12. Hendrickson JE, Tormey CA, Shaz BH. Red Blood Cell Alloimmunization Mitigation Strategies. *Transfus Med Rev*. julio de 2014;28(3):137-44.
13. Zalpuri S, Zwaginga JJ, Le Cessie S, Elshuis J, Schonewille H, Van Der Bom JG. Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions: RBC alloimmunization and transfusion exposure. *Vox Sang*. febrero de 2012;102(2):144-9.
14. O'Suoji C, Liem RI, Mack AK, Kingsberry P, Ramsey G, Thompson Alexis A. Alloimmunization in sickle cell anemia in the era of extended red cell typing: Alloimmunization in Sickle Cell Disease. *Pediatr Blood Cancer*. septiembre de 2013;60(9):1487-91.
15. Wilkinson K, Harris S, Gaur P, Haile A, Armour R, Teramura G, et al. Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease. *Transfusion (Paris)*. febrero de 2012;52(2):381-8.
16. Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, Martinez I, Nomdedeu B, Pereira A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion (Paris)*. abril de 2013;53(4):710-5.

17. ST Chou, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. noviembre de 2012;159(4):394-404.
18. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*. 19 de julio de 2012;120(3):528-37.
19. Zalpuri S, Middelburg RA, Schonewille H, de Vooght KMK, le Cessie S, van der Bom JG, et al. Intensive red blood cell transfusions and risk of alloimmunization. *Transfusion (Paris)*. febrero de 2014;54(2):278-84.
20. Panch SR, Montemayor-Garcia C, Klein HG. Hemolytic Transfusion Reactions. *N Engl J Med*. 11 de julio de 2019;381(2):150-62.
21. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 23 de enero de 2018;9(6):7204-18.
22. Hendrickson JE. Red blood cell alloimmunization: of mice, men, and women. 2011;
23. Markati T, Oskoui M, Farrar MA, Duong T, Goemans N, Servais L. Emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol*. 1 de septiembre de 2022;21(9):814-29.
24. Boursereau R, Abou-Samra M, Lecompte S, Noel L, Brichard SM. Downregulation of the NLRP3 inflammasome by adiponectin rescues Duchenne muscular dystrophy. *BMC Biol*. diciembre de 2018;16(1):33.
25. Cea LA, Puebla C, Cisterna BA, Escamilla R, Vargas AA, Frank M, et al. Fast skeletal myofibers of mdx mouse, model of Duchenne muscular dystrophy, express connexin hemichannels that lead to apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. julio de 2016;73(13):2583-99.
26. PNSEA1.pdf [Internet]. [citado 2 de julio de 2023]. Disponible en: <https://nucleus.usal.es/sites/default/files/servicios/sea/formularios/PNSEA1.pdf>

27. Skordos I, Demeyer A, Beyaert R. Analysis of T cells in mouse lymphoid tissue and blood with flow cytometry. *STAR Protoc.* marzo de 2021;2(1):100351.
28. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J.* 2002;43(4):207-13.
29. Calabro S, Gallman A, Gowthaman U, Liu D, Chen P, Liu J, et al. Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. *J Exp Med.* 30 de mayo de 2016;213(6):887-96.
30. Brennan E, Kantharidis P, Cooper ME, Godson C. Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function. *Nat Rev Nephrol.* noviembre de 2021;17(11):725-39.
31. Pelosi L, Berardinelli MG, Forcina L, Spelta E, Rizzuto E, Nicoletti C, et al. Increased levels of interleukin-6 exacerbate the dystrophic phenotype in mdx mice. *Hum Mol Genet.* 1 de noviembre de 2015;24(21):6041-53.
32. Steiniger BS. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology.* 2015;145(3):334-46.
33. Ryder AB, Zimring JC, Hendrickson JE. Factors Influencing RBC Alloimmunization: Lessons Learned from Murine Models. *Transfus Med Hemotherapy.* noviembre de 2014;41(6):406-19.
34. Desai PC, Deal AM, Pfaff ER, Qaqish B, Hebden LM, Park YA, et al. Alloimmunization is associated with older age of transfused red blood cells in sickle cell disease. *Am J Hematol.* agosto de 2015;90(8):691-5
35. Bao W, Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K. Regulatory T-cell status in red cell alloimmunized responder and nonresponder mice. *Blood.* 28 de mayo de 2009;113(22):5624-7

36. Chang L, Niu F, Chen J, Cao X, Liu Z, Bao X, et al. Ghrelin improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Life Sci.* 1 de septiembre de 2019; 232:116654.
37. Gibb DR, Calabro S, Liu D, Tormey CA, Spitalnik SL, Zimring JC, et al. The Nlrp3 Inflammasome Does Not Regulate Alloimmunization to Transfused Red Blood Cells in Mice. *EBioMedicine.* julio de 2016; 9:77-86.
38. Soslow JH, Markham LW, Burnette WB, Galindo CL, Feoktistov I, Raucci FJ, et al. Increased Number of Circulating CD8/CD26 T Cells in the Blood of Duchenne Muscular Dystrophy Patients Is Associated with Augmented Binding of Adenosine Deaminase and Higher Muscular Strength Scores. *Front Pharmacol.* 2017; 8:914.
39. Pinto-Mariz F, Carvalho LR, de Mello W, Araújo A de QC, Ribeiro MG, Cunha M do CSA, et al. Differential integrin expression by T lymphocytes: potential role in DMD muscle damage. *J Neuroimmunol.* junio de 2010;223(1-2):128-30.
40. Pinto-Mariz F, Rodríguez Carvalho L, Prufer De Queiroz Campos Araujo A, De Mello W, Gonçalves Ribeiro M, Cunha MDCSA, et al. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle.* 2015; 5:45.
41. Farini A, Sitzia C, Villa C, Cassani B, Tripodi L, Legato M, et al. Defective dystrophic thymus determines degenerative changes in skeletal muscle. *Nat Commun.* 8 de abril de 2021;12(1):2099.
42. Dowling P, Gargan S, Zweyer M, Henry M, Meleady P, Swandulla D, et al. Proteome-wide Changes in the mdx-4cv Spleen due to Pathophysiological Cross Talk with Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle. *iScience.* 26 de agosto de 2020;23(9):101500.
43. Shin JH, Hakim CH, Zhang K, Duan D. Genotyping mdx, mdx3cv, and mdx4cv mice by primer competition PCR. *Muscle Nerve.* febrero de 2011;43(2):283-6.

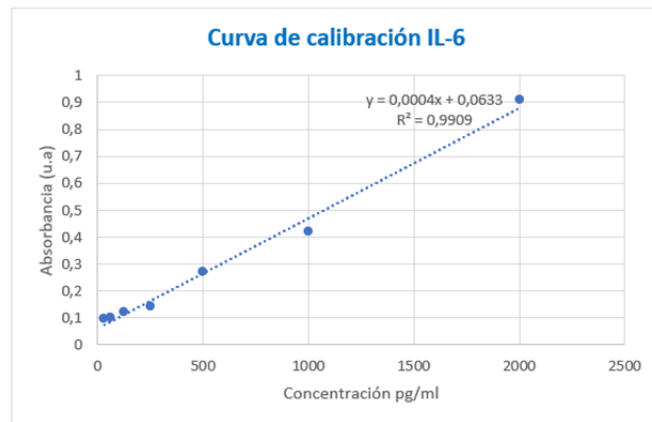
44. González Parias JL, Duque Giraldo VE, Velásquez-Lopera MM. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*. 1 de abril de 2010;29(2):74-84.
45. Saavedra Hernández D. La molécula CD28 y su función en la activación de células T. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter*. diciembre de 2013;29(4):359-67.
46. Citoquinas inflamatorias en la distrofia muscular de Duchenne: una revisión narrativa | *Revista Electrónica Colección Salud*. 21 de diciembre de 2021 [citado 23 de agosto de 2023]; Disponible en: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/8992>
47. Nitahara-Kasahara Y, Takeda S, Orada T. Inflammatory predisposition predicts disease phenotypes in muscular dystrophy. *Inflamm Regen*. 5 de septiembre de 2016;36(1):14.
48. De Paepe B, De Bleecker JL. Cytokines and Chemokines as Regulators of Skeletal Muscle Inflammation: Presenting the Case of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mediators Inflamm*. 5 de noviembre de 2013;2013: e540370.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Curva de Calibración.

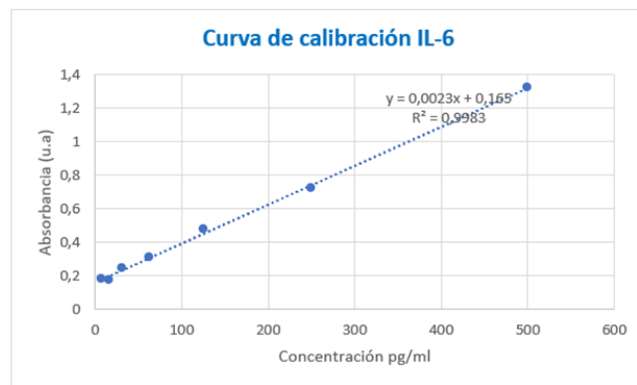
Invitrogen Mouse IL-16 ELISA KIT LOTE: 297103-012 REF: BMS603
CADUCIDAD: 31-3-2025

Concentración (pg/ml)	Absorción (u.a)
2000	0,908
1000	0,419
500	0,27
250	0,144
125	0,124
62,5	0,103
31,1	0,097



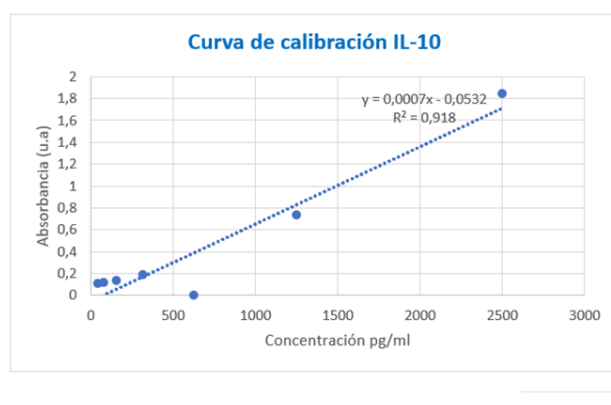
Invitrogen Mouse IL-6 ELISA KIT LOTE: 302550-017 REF: KMC0061
CADUCIDAD: 31-12-2025

Concentración (pg/ml)	Absorción (u.a)
500	1,325
250	0,722
125	0,479
62,5	0,313
31,2	0,25
15,6	0,178
7,8	0,182



**Invitrogen Mouse IL-10 ELISA LOTE: 227819-025 REF: BMS614 CADUCIDAD:
31-8-2024**

Concentración (pg/ml)	Absorción (u.a)
2500	1,846
1250	0,739
625	0,360
313	0,187
156	0,14
78	0,118
39	0,108



11.2 Anexo 2. Descripción de pasos para realizar tinción Hematoxilina eosina (H&E).

En las secciones siguientes se describen los pasos básicos para realizar una tinción con H&E. Primero retire la parafina para realizar una tinción H&E es disolver toda la cera con xileno (un disolvente hidrocarbonado). Después de eliminar completamente la cera, se hace pasar la preparación por varios cambios de alcohol para eliminar el xileno y luego se enjuaga a fondo con agua. La sección ahora está hidratada para que los reactivos acuosos penetren fácilmente en las células y los elementos tisulares. La preparación ahora se tiñe con una tinción nuclear como la hematoxilina de Harris, que consiste en un colorante (hematoxilina oxidada) y un mordiente o agente aglutinante (una sal de aluminio) en solución. Inicialmente, esto tiñe los núcleos y algunos otros elementos de color morado rojizo. Después de aclarar en agua, la sección se vuelve azul mediante el tratamiento con una solución débilmente alcalina. Este paso tiñe la hematoxilina de un color azul oscuro. Ahora se puede enjuagar y comprobar la sección para ver si los núcleos están correctamente teñidos y muestran el contraste adecuado y para evaluar el nivel de tinción de fondo. En la mayoría de las ocasiones, cuando se emplea hematoxilina de Harris, se requiere un paso de diferenciación para eliminar la tinción de fondo no específica y mejorar el contraste. Se utiliza un alcohol ácido débil. Después de este tratamiento, se requiere de nuevo el proceso de azulado y enjuagar a fondo. Los métodos de tinción que incluyen un paso de diferenciación se denominan tinciones "regresivas". La sección se tiñe ahora con una solución acuosa o alcohólica de eosina. Esto tiñe muchos elementos no nucleares en diferentes tonos de rosa. Tras la tinción con eosina, la preparación pasa por varios cambios de alcohol para eliminar todos los restos de agua, y luego se aclara con varios baños de xileno, el cual "limpia" el tejido y lo hace completamente transparente. Se aplica una fina capa de medio de montaje de poliestireno, seguida de un cubreobjetos de vidrio. Si la tinción y todos los pasos posteriores se han realizado correctamente, la preparación revelará todos los componentes microscópicos importantes y permanecerá estable durante muchos años.

11.3 Anexo 3. Acta de evaluación Bioética.

ACTA DE EVALUACION BIOETICA CBC 38/2022

1. El Comité de Bioética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valparaíso, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto de tesis de Magister *"Impacto de la inflamación crónica sobre el riesgo a la aloinmunización después de la transfusión de glóbulos rojos en un modelo murino de Distrofia muscular de Duchenne"*, del cual el investigador responsable es el Sr. Luis Paolo Rojas Lemus y la investigadora patrocinante es la Dra. Arlek Gonzalez Jamett.
2. Para su evaluación el Comité de Bioética reviso los antecedentes presentados en el *"Formulario de Solicitud de Aprobación para Investigación en Animales como Sujetos de Investigación"*
3. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto de Valoración de Aspectos Éticos del formulario *"Solicitud de Aprobación para Investigación en Animales como Sujetos de Investigación"* y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.
4. Por lo anterior, el Comité de Bioética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valparaíso, aprueba el protocolo experimental del proyecto con una duración de 12 meses.


Andrés Chávez Navarrete
Presidente
Comité de Bioética, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso



Valparaíso, 24 de Junio del 2022.