

UAH

**Estudio de la funcionalidad de los receptores TLRs en el pulmón y en otros órganos linfoides en poblaciones de células B utilizando el modelo neonatal de ratón**

**Study of the functionality of TLRs receptors in the lung and other lymphoid organs in B-cell populations using the neonatal mouse model**

**Máster Universitario en Microbiología aplicada a la Salud Pública e Investigación en Enfermedades Infecciosas**

**Presentado por:**

**D<sup>a</sup> YOLANDA CAMPANERO NÚÑEZ**

**Dirigido por:**

**Dra. ISABEL CORTEGANO JIMENO**

**Dra. CAROLINA RUIZ SÁNCHEZ**

**Alcalá de Henares, a 19 de Julio de 2023**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1-RECEPTORES TIPO TOLL.....	6
1.2-ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS TLRs.....	7
1.3-EXPRESIÓN DE TLRs EN LINFOCITOS B .....	9
1.3.1 Linfocitos convencionales B2 .....	9
1.3.2 Linfocitos B1 .....	10
1.3.3 Linfocitos B1Rel .....	10
1.4-CÉLULAS INMUNES DEL PULMÓN.....	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	11
3.2-OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	12
3.3- CITOMETRÍA DE FLUJO .....	12
3.3.1 Análisis <i>ex vivo</i> : Marcaje intracelular (TLR3, 7 y 9).....	12
3.3.2 Análisis <i>in vitro</i> : Viabilidad, proliferación y diferenciación .....	14
3.4- CULTIVOS CELULARES.....	16
3.5- CUANTIFICACIÓN DE IgM TOTAL (TÉCNICA ELISA).....	17
3.6- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Resultados del análisis <i>ex vivo</i> : Marcaje intracelular (TLR3, 7 Y 9) .....	18
4.2 Resultados del análisis <i>in vitro</i> : Viabilidad, proliferación y diferenciación.....	19
4.3 Producción diferencial de IgM en respuesta a agonistas de TLRs: ELISA de IgM total .....	22
5. DISCUSIÓN .....	23
6. CONCLUSIONES.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA .....	29
8. AGRADECIMIENTOS .....	34

## RESUMEN

El sistema inmunitario innato utiliza los llamados receptores tipo Toll (TLR) para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y peligros (DAMPs). Diferentes subpoblaciones de linfocitos B expresan TLRs que inducen producción de inmunoglobulinas y promueven la respuesta adaptativa. Estudios previos del laboratorio de inmunobiología demuestran que los TLRs extracelulares TLR2 y TLR4 interfieren en la viabilidad, proliferación y diferenciación de células B en pulmón de ratón neonatal. Como continuación de estos resultados, planteamos la hipótesis de que los TLRs intracelulares (TLR3, 7 y 9) interfieren en la homeostasis de las células B. Nuestro objetivo fue demostrar la presencia de estos TLRs en las células B del pulmón y demostrar cambios en la viabilidad, proliferación y diferenciación celular después de estimular estos TLRs con ligandos, así como cuantificar los niveles totales de IgM producidos por las células estimuladas. Realizamos un análisis *ex vivo* para evaluar la expresión de los TLRs intracelulares en estas células e hicimos cultivos celulares para estimular las células B con ligandos de TLR3, 7 y 9. Utilizamos citometría de flujo para analizar cambios en los parámetros de viabilidad, proliferación y diferenciación. Determinamos los niveles de IgM en los sobrenadantes de los cultivos utilizando la técnica ELISA. Nuestro estudio demostró la presencia de los TLRs intracelulares en las células B del pulmón neonatal y su implicación en la viabilidad y proliferación. No observamos efectos significativos en la diferenciación, solo se encontraron diferencias en la producción de IgM en células de bazo estimuladas con el ligando de TLR7.

**Palabras clave:** Receptores tipo Toll (TLRs), inmunidad innata, inmunidad adquirida, linfocitos B, pulmón, inmunoglobulinas, células B2 & células B1Rel.

## ABSTRACT

The innate immune system utilizes receptors so-called Toll-like receptors (TLRs) to recognize molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) and dangers (DAMPs). Different subpopulations of B lymphocytes express TLRs that induce immunoglobulin production and promote adaptive response. Previous studies from the immunobiology laboratory have shown that extracellular TLRs, TLR2 and TLR4, interfere with the viability, proliferation, and differentiation of B cells in the neonatal mouse lung. Building upon these results, we hypothesized that intracellular TLRs (TLR3, 7, and 9) also interfere with B cell homeostasis. Our objective was to demonstrate the presence of these TLRs in lung B cells and to show changes in cell viability, proliferation, and differentiation after stimulating these TLRs with

ligands, as well as to quantify the total levels of IgM produced by the stimulated cells. We performed an *ex vivo* analysis to evaluate the expression of intracellular TLRs in these cells and conducted cell cultures to stimulate B cells with TLR3, 7, and 9 ligands. We used flow cytometry to analyze changes in viability, proliferation, and differentiation parameters. We determined IgM levels in the culture supernatants using the ELISA technique. Our study demonstrated the presence of intracellular TLRs in neonatal lung B cells and their involvement in viability and proliferation. We did not observe significant effects on differentiation, except for differences in IgM production in spleen cells stimulated with the TLR7 ligand.

**Keywords:** Toll-like receptors (TLRs), innate immunity, acquired immunity, B lymphocytes, lung, immunoglobulins, B2 cells & B1Rel cells.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1-RECEPTORES TIPO TOLL

El sistema inmune innato cuenta con una red de receptores altamente conservados a lo largo de la evolución, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Esta red engloba receptores como los TLR (receptores tipo Toll, del inglés Toll-Like-Receptors), que desempeñan un papel crucial en la inmunidad innata, que constituye la primera línea de defensa del cuerpo contra los patógenos. Los TLRs son esenciales en la detección y respuesta a diversos agentes infecciosos, como bacterias, virus y hongos. Su función es fundamental para desencadenar respuestas inmunes eficientes y contribuir a la protección del organismo<sup>1</sup>.

Los TLRs reconocen una amplia variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Entre estos patrones están los componentes de la pared celular bacteriana, la membrana plasmática, diversas toxinas y material genético de los patógenos<sup>2</sup>. Recientemente, se han realizado estudios que indican que estos receptores también reconocen ligandos endógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs). Estos DAMPs son liberados por las células del huésped en respuesta a señales de peligro del propio organismo<sup>3</sup>.

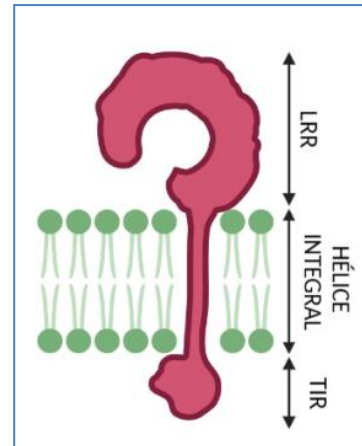
Tras la unión a su ligando, la activación a través de los TLRs desencadena una serie de eventos de señalización intracelular que resultan en la producción de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas e interferones (IFN), además de la expresión de moléculas coestimuladoras. Estos procesos en conjunto promueven la posterior activación de la respuesta inmune adaptativa<sup>4</sup>.

Los TLRs se encuentran en diferentes tipos de células:

1. En las células innatas, como los granulocitos, desempeñan un papel importante en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria.
2. En las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos, monocitos, células dendríticas y linfocitos B, los TLRs participan en la activación de la respuesta inmune adaptativa y regulan sus funciones.
3. También se expresan en las células epiteliales de tejidos barrera, como por ejemplo el pulmón.

## 1.2-ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS TLRs

Los TLR son glicoproteínas transmembrana de tipo I que activan vías de señalización mediante dominios de interacción, la estructura de estos receptores (Figura 1) consiste en un dominio extracelular que reconoce ligandos, el cual está compuesto por repeticiones ricas en leucina (**LRR**), un dominio de señalización citoplasmática llamado receptor Toll/IL-1 (**TIR**), que es necesario para desencadenar las vías de señalización y tiene similitud a la familia de receptores IL-1. Ambos dominios se encuentran unidos por una hélice simple transmembrana que determina la ubicación celular<sup>5,6</sup>.



**Figura 1: Estructura de los TLRs.**

Los TLRs son proteínas transmembrana formadas por un dominio extracelular (LRR) y un dominio intracelular (TIR) unidos por una hélice simple integral.

Hasta el momento, se han identificado 10 miembros de la familia TLR en la especie humana y al menos 13 en ratón<sup>7</sup>. Cada uno de ellos posee diferentes ligandos específicos, perfiles de expresión y localizaciones particulares (Figura 2).

Los TLRs se clasifican en dos grupos según su localización en la célula (Tabla 1). El primer grupo se compone de los TLRs que se encuentran en la membrana plasmática, e incluye TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10. El segundo grupo se localiza en compartimentos intracelulares como el endosoma y el retículo endoplásmico, e incluye TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9<sup>8</sup>. Los TLRs intracelulares reconocen ácidos nucleicos no propios, a diferencia de los TLRs extracelulares que principalmente reconocen ligandos lipídicos o proteicos<sup>9</sup>.

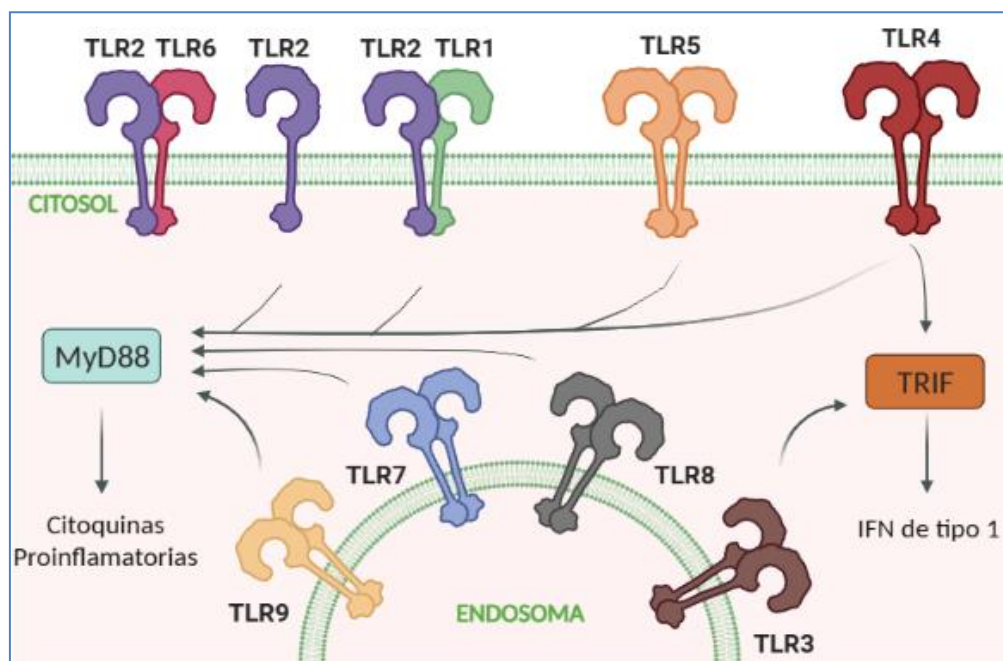
**Tabla 1:** Principales características de los TLRs en mamíferos.

TLR	LOCALIZACIÓN	PAMPs	ADAPTADOR
TLR1	MEMBRANA PLASMÁTICA	PEPTIDOGLICANO Y LIPOPÉPTIDOS	MyD88
TLR2	MEMBRANA PLASMÁTICA		MyD88
TLR6	MEMBRANA PLASMÁTICA		MyD88
TLR4	MEMBRANA PLASMÁTICA	LPS	MyD88 Y TRIF
TLR5	MEMBRANA PLASMÁTICA	FLAGELINA	MyD88

<b>TLR3</b>	MEMBRANAS INTRACELULARES	ARN BICATENARIO	TRIF
<b>TLR7</b>	MEMBRANAS INTRACELULARES	ARN	MyD88
<b>TLR8</b>	MEMBRANAS INTRACELULARES	MONOCATENARIO	MyD88
<b>TLR9</b>	MEMBRANAS INTRACELULARES	ADN CpG	MyD88
<b>TLR10</b>	MEMBRANA PLASMÁTICA	PROFILINA	MyD88
<b>TLR11</b>	MEMBRANA PLASMÁTICA	FLAGELINA	MyD88
<b>TLR12</b>	MEMBRANA PLASMÁTICA	PROFILINA	MyD88
<b>TLR13</b>	MEMBRANA PLASMÁTICA	ARNr	MyD88

**Tabla 1:** Principales características de los TLRs en mamíferos.

La vía de señalización a través de TLRs se inicia cuando el dominio TIR de los TLR se une a moléculas adaptadoras intracelulares. El adaptador conocido como MyD88 induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-12 y TNF- $\alpha$ , y es utilizado por todos los TLR, excepto por TLR3. Además, existe otro adaptador llamado TRIF que está asociado a la inducción del interferón tipo I, y es utilizado por TLR3 y TLR4<sup>10</sup>.



**Figura 2:** Localización y vías de señalización de los TLRs. Los TLRs se clasifican según su localización celular, existen TLRs de membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10) e intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9).

### 1.3-EXPRESIÓN DE TLRs EN LINFOCITOS B

Los linfocitos B son células del sistema inmune adaptativo que desempeñan un papel importante en la inmunidad humoral. Durante las respuestas inmunes humorales, se generan inmunoglobulinas de diferentes isotipos. La IgM es una de las cinco inmunoglobulinas presentes en mamíferos y constituye aproximadamente el 6% de la cantidad de Igs totales en sangre. Este anticuerpo es el primero que se produce en la respuesta inmunitaria<sup>11</sup>.

Las células B se originan a partir de células madre en la médula ósea y su principal función es proteger al organismo frente a agentes infecciosos mediante la producción de anticuerpos. Además de esta función, los linfocitos B también desempeñan otras tareas, como presentar antígenos a los linfocitos T, y, mediante la secreción de citoquinas, regular negativamente las respuestas inflamatorias y modular las respuestas frente a autoantígenos<sup>12</sup>. Hasta ahora, se han identificado diferentes poblaciones de linfocitos B, en función de su fenotipo, localización y función.

#### 1.3.1 Linfocitos convencionales B2

Los linfocitos B2, también conocidos como células B convencionales, se generan en el adulto a partir de células madre en la médula ósea y migran posteriormente a los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos y el bazo. Estos linfocitos B2 desempeñan un papel esencial en la inmunidad adaptativa pues al interactuar con antígenos extraños, se activan y en respuesta a esta activación proliferan y se diferencian a células plasmáticas, que son las principales responsables de la producción de anticuerpos<sup>13</sup>.

La transformación de los linfocitos B a células plasmáticas produce cambios evidentes en sus características morfofuncionales. Estos cambios incluyen un aumento de tamaño y una mayor proporción de citoplasma en comparación con las células B. Además, las células plasmáticas presentan un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi muy desarrollados y carecen de inmunoglobulinas de membrana ya que secretan al medio extracelular. Las células plasmáticas se alojan en los órganos linfoides secundarios y en la médula ósea, y tienen una vida media variable<sup>14</sup>. Estas células se caracterizan por expresar moléculas específicas en su membrana, entre ellas el CD138 (sindecano-1), lo que permite



su identificación mediante citometría de flujo<sup>15</sup>.

### 1.3.2 Linfocitos B1

La subpoblación de linfocitos B1 posee características de ambos tipos de respuestas inmunitarias, tanto innata como adaptativa, por ello se las conoce como células pseudoinnatas. Se localizan generalmente en la cavidad pleural y en el peritoneo, sobre todo en las primeras etapas de la vida. Además expresan CD11b y CD5 en su membrana. Su respuesta es rápida y poco específica, y generan anticuerpos IgM pero de baja afinidad<sup>16</sup>.

### 1.3.3 Linfocitos B1Rel

El laboratorio de Inmunobiología del CNM ha descrito recientemente otra población de linfocitos B denominada B1Rel, muy similar a las células B1. Esta población también se denomina pseudoinnata<sup>17</sup>.

Estas células presentan varias características distintivas: se originan durante el desarrollo fetal, exhiben un estado de preactivación que les permite generar respuestas rápidas y multiespecíficas, tienen la capacidad de secretar espontáneamente IgM, IgG e IgA y mantienen una población estable a lo largo de toda la vida<sup>18</sup>. Además, se ha publicado la presencia de estas células de origen embrionario CD19+B220lo/- en bazo, pulmón e hígado de individuos adultos<sup>19</sup>.

Tanto en las células B humanas como en las células B murinas se han detectado diversos tipos de TLRs. Actualmente, se considera que estos receptores en los linfocitos B pueden ser objetivos alternativos para el desarrollo de nuevas estrategias vacunales y terapias innovadoras. Investigaciones previas demostraron que la estimulación de células B maduras, con ligandos de los receptores TLR, provoca la proliferación y diferenciación de las células B en células plasmáticas, así como la secreción de citoquinas y, finalmente, la producción de anticuerpos<sup>20</sup>. Estas aproximaciones podrían tener un impacto significativo en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, como alergias, cáncer, enfermedades autoinmunes, obesidad y aterosclerosis, entre otras<sup>21</sup>.

Investigaciones llevadas a cabo en la unidad de Inmunobiología del CNM (ISCIH) han demostrado que durante la etapa neonatal, los receptores TLR4 y TLR2 se expresan de manera funcional en diversas poblaciones de linfocitos B en pulmón<sup>22</sup>, contribuyendo así a su mantenimiento homeostático.

## 1.4-CÉLULAS INMUNES DEL PULMÓN

El pulmón es un órgano con una superficie epitelial extensa que entra en contacto directo con el ambiente externo desempeñando un papel fundamental en el intercambio gaseoso. En este estudio resaltamos la relevancia del pulmón como órgano inmunitario, en el que se encuentran células del sistema inmune tanto innatas como adaptativas, desempeñando un papel crucial en la generación de una respuesta inmunitaria potente frente a agentes patógenos para el sistema respiratorio. Las células del sistema inmunitario presentes en el pulmón maduran en el entorno postnatal, influidas por la naturaleza y la cantidad de exposición a los antígenos del huésped. Entre las células inmunitarias presentes en el pulmón, destacan los macrófagos, que se dividen en macrófagos alveolares y macrófagos intersticiales. Además, están presentes las células NK (natural killer) y las células inmunitarias adaptativas, como las células T y B<sup>23</sup>.

Cuando los antígenos colonizan el pulmón, se produce un incremento y expansión de los linfocitos B, que desempeñan un papel crucial en la generación de respuestas humorales protectoras a nivel local<sup>24</sup>.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Resultados previos mostraron la contribución de TLR2 y TLR4, presentes en las membranas de linfocitos B, al mantenimiento y homeostasis de poblaciones B en pulmón de ratones neonatos. Planteamos la hipótesis de que los TLRs intracelulares (3, 7 y 9) podrían también estar implicados en dicho mantenimiento celular.

### OBJETIVOS

1. Demostrar la presencia de TLRs intracelulares en células B de pulmón y bazo.
2. Determinar la implicación de estos TLRs en la viabilidad, proliferación y diferenciación celular.
3. Cuantificar los niveles totales de IgM en los sobrenadantes de los cultivos estimulados.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones adultos y neonatos de 7 días,

pertenecientes a la cepa C57BL/6J (BL6). Los ratones adultos fueron sacrificados por eutanasia empleando CO<sub>2</sub> y los neonatos de 7 días por decapitación.

Todos los procedimientos experimentales con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las indicaciones ordenadas por el Comité de Ética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III y la aprobación de la Comunidad de Madrid PROEX (Nº282.4/20).

### **3.2-OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Los órganos se obtuvieron mediante disgregación mecánica utilizando el émbolo de jeringuillas de 2 mL (BD Emerald™, Syringe) y filtros de 40 µm de poro (Corning Cell Strainer) sobre tubos de centrifuga de 50 mL (Corning) a los que se les añadió una disolución de PBS1X (BioWhittaker<sup>R</sup>, Lonza) y Suero Fetal Bovino al 2% (Gibco) (solución de tinción), hasta obtener un volumen final de 10 mL que contenía las suspensiones celulares del órgano en cuestión. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad empleando una cabina de flujo laminar.

A continuación, se centrifugaron las suspensiones a 1250 rpm (250G) 5 minutos a 4°C. En el caso de las muestras de pulmón se descartó el sobrenadante y al pellet se le añadieron 10 mL de solución de tinción, dejando así las suspensiones celulares preparadas para llevar a cabo los posteriores protocolos.

La preparación de los bazos adultos necesitó un paso previo para lisar los eritrocitos, para ello, se resuspendió el pellet en 800 µL de buffer de lisis (ACK Lysing Buffer, Gibco) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavó con solución de tinción y se centrifugó siguiendo el mismo protocolo que el resto de los órganos. Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de un único órgano en el caso de los ratones adultos, y mediante pools de 2-3 individuos para los neonatos.

El conteo celular se realizó utilizando como colorante azul de tripán y contando las células en la cámara de Neubauer.

### **3.3- CITOMETRÍA DE FLUJO**

#### 3.3.1 Análisis *ex vivo*: Marcaje intracelular (TLR3, 7 y 9)

Para determinar el nivel basal de los TLRs intracelulares en la población de las células B de

los diferentes órganos se llevó a cabo el siguiente protocolo.

En primer lugar, las suspensiones celulares se bloquearon con 2,4G2 para evitar uniones inespecíficas. Tras una incubación de 10 minutos a 4°C, se lavaron las células con solución de tinción y se centrifugación a 1250 rpm (250G) 5 minutos a 4°C.

A continuación, se llevó a cabo un marcaje de superficie sobre el pellet obtenido con anticuerpos monoclonales acoplados a diferentes fluorocromos (Tabla 2), incubándose 20 minutos a 4°C en oscuridad. Además, se utilizó un kit de tinción de células muertas (LIVE/DEAD™ Fixable Aqua, Invitrogen) para determinar la viabilidad de éstas.

Transcurridos los 20 minutos de incubación, se lavaron las células con solución de tinción y se fijaron empleando un kit de fijación/permeabilización (BD Cytofix/Cytoperm™), se añadió la solución de fijación (BD Fix/Perm) durante 20 minutos a 4°C y se lavaron con la solución de lavado (BD Perm/Wash).

Por último, se realizó el marcaje intracelular añadiendo los anticuerpos intracelulares frente a los TLRs y el isotipo adecuado de control (Tabla 2), y se dejó incubando durante 24 horas a 4°C). Al día siguiente se lavaron con solución de tinción y se pasaron a tubos de citómetro.

Las preparaciones resultantes se analizaron en el citómetro FACSFortessa (5 láseres, BD) y los datos obtenidos se procesaron con el programa informático FlowJo (Tree Star).

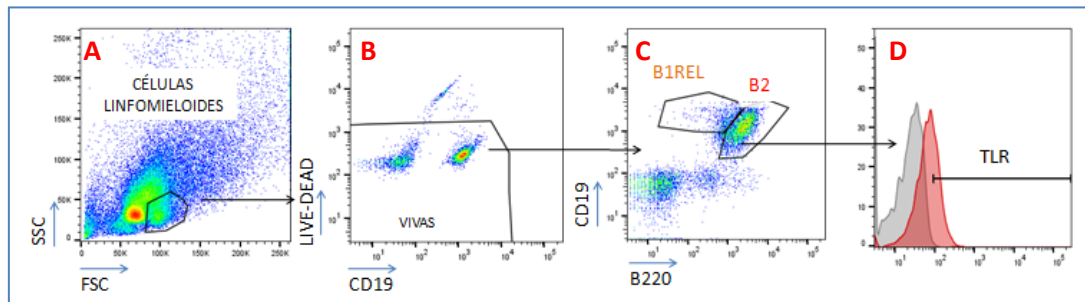
ANTICUERPO	FLUOROCROMO	CASA COMERCIAL	CLON	ORIGEN/ISOTIPO
<b>EXTRACELULAR</b>				
<b>B220</b>	PE-Cy7	BioLegend	RA3-6B2	Rata IgG2a
<b>CD19</b>	BV421, Violet	BioLegend	6D5	Rata IgG2a
<b>LIVE/DEAD</b>	BV510, Aqua	Invitrogen	-	-
<b>INTRACELULAR</b>				
<b>TLR3</b>	PE	BioLegend	11F8	Rata IgG1
<b>TLR7</b>	PE	BioLegend	A94B10	Rata IgG1
<b>TLR9</b>	PE	BioLegend	S18025A	Rata IgG1
<b>ISO</b>	PE	BioLegend	RTK2071	Rata IgG1

**Tabla 2:** Listado de anticuerpos extra/intracelulares empleados.

POBLACIÓN CELULAR	NOMBRE	FENOTIPO
Linfocitos B	B1Rel	B220+/- ; CD19+
	B2	B220+; CD19+

**Tabla 3:** Fenotipo de las poblaciones celulares estudiadas.

La estrategia de análisis de las células con el programa FlowJo se muestra en la Figura 3.



**Figura 3: Método de análisis por citometría de flujo de las poblaciones adultas y neonatales.** La figura contiene un ejemplo del análisis de las distintas poblaciones celulares empleando gráficas estilo dot plot e histograma. A) Diagrama de puntos tamaño celular (FSC) frente a complejidad (SSC). B) Descarte de células muertas utilizando live-dead. C) Diagrama de puntos de las células vivas marcadas con anti-CD19 y anti-B220. D) Análisis con histograma de la expresión de TLRs sobre la población de células B2.

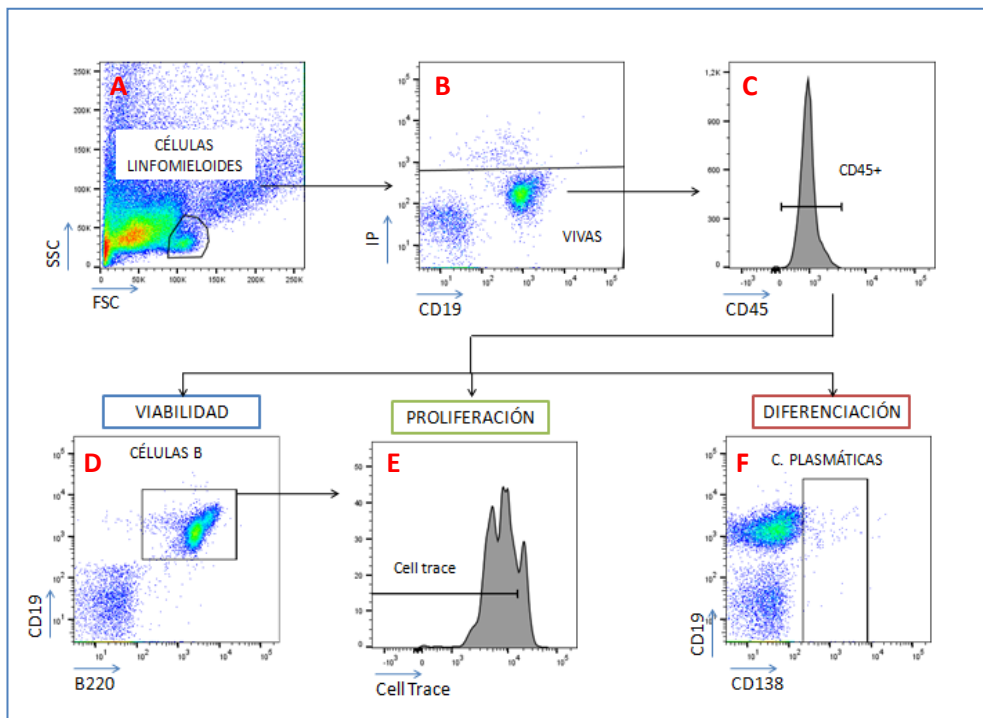
### 3.3.2 Análisis *in vitro*: Viabilidad, proliferación y diferenciación

Para llevar a cabo este estudio se contaron las células mediante la cámara de Neubauer y se utilizaron las células necesarias para realizar el cultivo a razón de  $2 \cdot 10^6$  células por pocillo y condición. Estas suspensiones celulares se incubaron con un trazador de proliferación celular CellTrace (CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, Invitrogen™) 20 minutos en oscuridad, se lavaron las células con solución de tinción y se centrifugaron a 1250 rpm (250G) durante 5 minutos a 4°C.

A continuación, se realizaron los cultivos celulares. Para ello, se resuspendieron las células en medio RPMI (Corning) completo (RPMI 1640 suplementado con L-Glutamina, piruvato, penicilina,  $\beta$ -Mercaptoetanol y 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco)) (Explicado en el apartado 3.4).

Transcurridos 3 días desde el inicio del cultivo se recogieron las células y se centrifugaron a 1250 rpm (250G) durante 5 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes para la determinación de IgM total (ver apartado 3.5) y se almacenaron a -20°C. Las células se

marcaron con distintos anticuerpos monoclonales (Tabla 4) 20 minutos en oscuridad a 4°C, los cuales nos permitieron determinar los parámetros de **proliferación** (por medio de la reducción de la señal de CellTrace), y **diferenciación** (células plasmáticas CD138+) (ver Tabla 4). Tras lavar las células con solución de tinción y centrifugarlas a 1250 rpm (250G) durante 5 minutos a 4°C, se resuspendieron los pellets en 100 µL de solución de tinción sobre tubos de citómetro a los que se les añadió ioduro de propidio (IP, 10 mM, Sigma), agente intercalante que tiñe las células muertas permitiéndonos determinar la **viabilidad**. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo. La estrategia de análisis en el citómetro de flujo se muestra en la Figura 4.



**Figura 4: Método de análisis por citometría de flujo de las poblaciones adultas y neonatales incubadas con los diferentes ligandos de TLRs.** La figura contiene un ejemplo del análisis de las distintas poblaciones celulares empleando gráficas estilo dot plot. A) Diagrama de puntos tamaño celular (FSC) frente a complejidad (SSC). B) Descarte de células muertas utilizando ioduro de propidio. C) Análisis con histograma de las células CD45+. D) Diagrama de puntos de las células vivas marcadas con anti-CD19 y anti-B220. E) Análisis con histograma de la proliferación de las células B con CellTrace. F) Diagrama de puntos de las células vivas marcadas con anti-CD19 y anti-CD138.

ANTICUERPO	FLUOROCROMO	CASA COMERCIAL	CLON	ORIGEN/ISOTIPO
<b>B220</b>	PE-Cy7	BioLegend	RA3-6B2	Rata IgG2a
<b>CD138</b>	APC	BioLegend	281-2	Rata IgG2a
<b>CD45</b>	FITC	BioLegend	OX-1	Rata IgG1
<b>CD19</b>	PE	Invitrogen	eBio-1D3	Rata IgG2a

**Tabla 4:** Anticuerpos utilizados en el análisis de proliferación, diferenciación y viabilidad de la población de células B.

### 3.4- CULTIVOS CELULARES

A partir de las suspensiones celulares, previamente marcadas con CellTrace (explicado en el apartado 3.3.2) se realizaron cultivos celulares empleando el incubador Steri-Cycle 160 (Thermo Scientific) que mantiene unas condiciones de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad.

Se pusieron las muestras en una placa de 48 pocillos (Nuclon Surface, Nunc™) a una concentración de 2.10<sup>6</sup> células (tanto de bazo como de pulmón) en 300 µL de RPMI (Corning) completo y se añadieron ligandos de los TLRs (ver Tabla 5).

LIGANDO	NOMBRE	CASA COMERCIAL	RECEPTOR
<b>PAM3CSK4</b>	Lipoproteína triacilada sintética	InvivoGen	<b>TLR2/TLR1</b>
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido	Sigma-Aldrich	<b>TLR4</b>
<b>POLI (I:C)</b>	Ácido poliinosínico-policitidílico	InvivoGen	<b>TLR3</b>
<b>IMIQUIMOD</b>	Amina imidazolinolina	InvivoGen	<b>TLR7</b>
<b>CPG</b>	Dinucleótido de citosina guanosina	ODN InvivoGen	<b>TLR9</b>
<b>NON CPG</b>	Dinucleótido de citosina guanosina	ODN Control InvivoGen	

**Tabla 5:** Listado de Ligandos de TLRs empleados en el cultivo celular de bazo y pulmón.

Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, y cada día se observaron en un microscopio Leica DMI3000B acoplado a una cámara Leica DF420 (leica, Wetzlar) que nos permitió hacer imágenes de los cultivos.

### 3.5- CUANTIFICACIÓN DE IgM TOTAL (TÉCNICA ELISA)

Con el objetivo de demostrar que la estimulación de los TLRs intracelulares provoca la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos mencionados anteriormente (ver apartado 3.4) después de 72 horas de estimulación. Posteriormente, se procedió a calcular los niveles de IgM total mediante la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

En primer lugar, se tapizó una placa de 96 pocillos (Thermo Scientific) con anticuerpo anti-inmunoglobulina (Goat Anti-Mouse Ig, SouthernBiotech), diluido en un buffer de tapizado, para permitir que todas las inmunoglobulinas presentes en el sobrenadante se adhieran a la placa. La placa se dejó incubando durante 24 horas a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación, se lavó la placa con PBS1X y se bloqueó con PBS0,5% con el fin de evitar uniones inespecíficas. La placa, se dejó incubando 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 50 µL de los sobrenadantes por duplicado en cada pocillo de la placa, junto con las diluciones necesarias para obtener la curva de calibración utilizando patrones de referencia, y se incluyeron controles negativos (Blancos) utilizando PBS0,5%. Se incubó 2 horas a 37°C.

A continuación, se marcó la placa con anticuerpo anti-IgM unido a biotina (Goat Anti-Mouse IgM, SouthernBiotech) diluido en PBS0,05% con 0,1% de Tween. Tras 1 hora de incubación a 37°C y lavar la placa, se añadió estreptavidina unida a HRPO (BioLegend<sup>R</sup>) y se incubó 30 minutos a 37°C. La estreptavidina se une fuertemente a la biotina previamente añadida para amplificar la señal generada durante la reacción. HRPO es una peroxidasa que cambiará de color al añadirle un sustrato cromogénico, por lo tanto, el siguiente paso, tras lavar la placa, es añadirle el sustrato, en este caso empleamos OPD (o-fenilendiamina) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disuelto en buffer citrato, el OPD se convierte en un producto oxidado coloreado, generalmente de color amarillo a marrón, dependiendo de las condiciones y del tiempo de reacción tras entrar en contacto con HRPO.

Por último, se paró la reacción al observar color con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se leyó la absorbancia de cada pocillo a 492 nm utilizando un lector de placas (Multieskan FC, Thermo Scientific).

### 3.6- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU), se calcularon y representaron las medias y el error



estándar de la media (SEM). Se realizó el test estadístico t-Student para datos no pareados. El nivel de significación estadística se representó en las gráficas de la siguiente manera: \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\* P<0,001, y \*\*\*\* P<0,0001.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados del análisis *ex vivo*: Marcaje intracelular (TLR3, 7 Y 9)

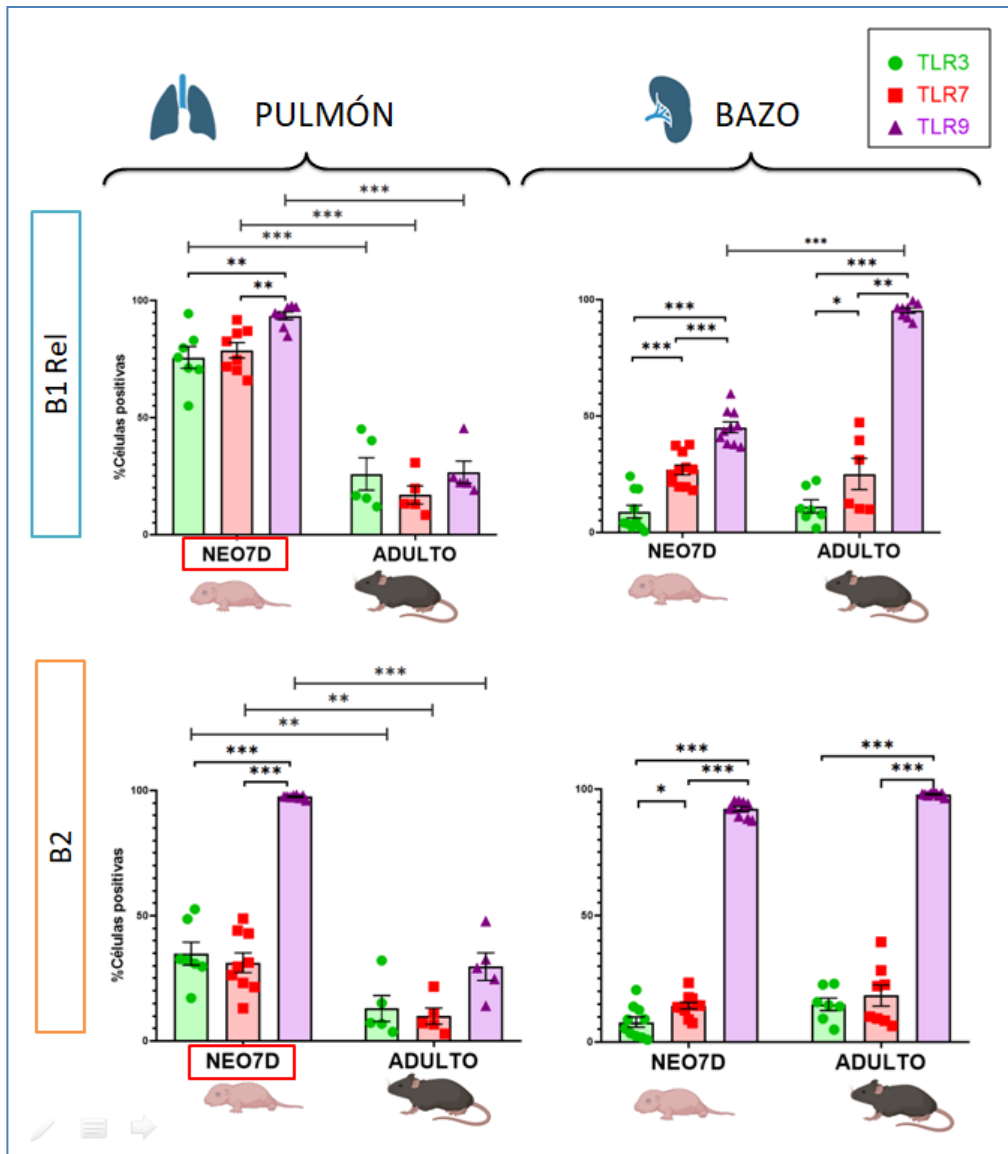
Se evaluaron los porcentajes de células positivas para los TLRs intracelulares (TLR3, 7 y 9) en las poblaciones B2 y B1Rel del bazo y pulmón en modelos de ratón adulto y neonato de 7 días utilizando citometría de flujo. Se utilizaron suspensiones celulares marcadas con diferentes anticuerpos o isotipos. En la Figura 5 se presentan los resultados de este experimento, donde en todos los casos obtuvimos expresión de los TLRs estudiados.

En relación a la población B1Rel, se observó una alta expresión de todos los TLRs en los pulmones de neonatos. El TLR9 mostró expresión en prácticamente el 100% de las células de esta población (93.5%), seguido por el TLR7 (78.7%) y, por último, el TLR3 (75.7%). Al comparar estos resultados con los obtenidos en pulmones de ratones adultos encontramos una menor expresión de todos los TLRs (TLR9 26.7%, TLR7 17% y TLR3 25.9%).

En el bazo, la expresión de TLR3 y TLR7 es similar en el neonato y el adulto, mientras la expresión de TLR9 es mayor en el adulto. Estos resultados muestran una mayor expresión de TLRs intracelulares en las células B1Rel en pulmón de neonato en comparación con cualquier otra condición estudiada.

En los linfocitos B2, en los pulmones de neonatos hay una expresión elevada de TLR9 (98.3%) similar a la observada en la población B1Rel. Sin embargo, presentan una menor expresión de TLR7 (31.2%) y TLR3 (34.8%). En cualquier caso, todos los TLRs en pulmón de neonatos se expresan en niveles más altos que en los pulmones de adultos. Esto indica nuevamente que la expresión de estos TLRs en pulmón disminuye a medida que avanza la edad.

En el bazo, la expresión de los TLRs en las células B2 es similar tanto en adultos como en neonatos, manteniendo la tendencia de una mayor expresión de TLR9, seguido de TLR7 y, por último, TLR3. Estos resultados son semejantes a los encontrados en la población B1Rel.



**Figura 5:** Representación en diagramas de barras de la expresión de TLR3, TLR7 y TLR9 en las poblaciones B1Rel y B2 del bazo y pulmón de ratón neonato y adulto. Cada punto representa una muestra (Pulmón neonato n=9, adulto n=5; Bazo neonato n=11, adulto n=7). Las diferencias estadísticas se muestran como media + SEM \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

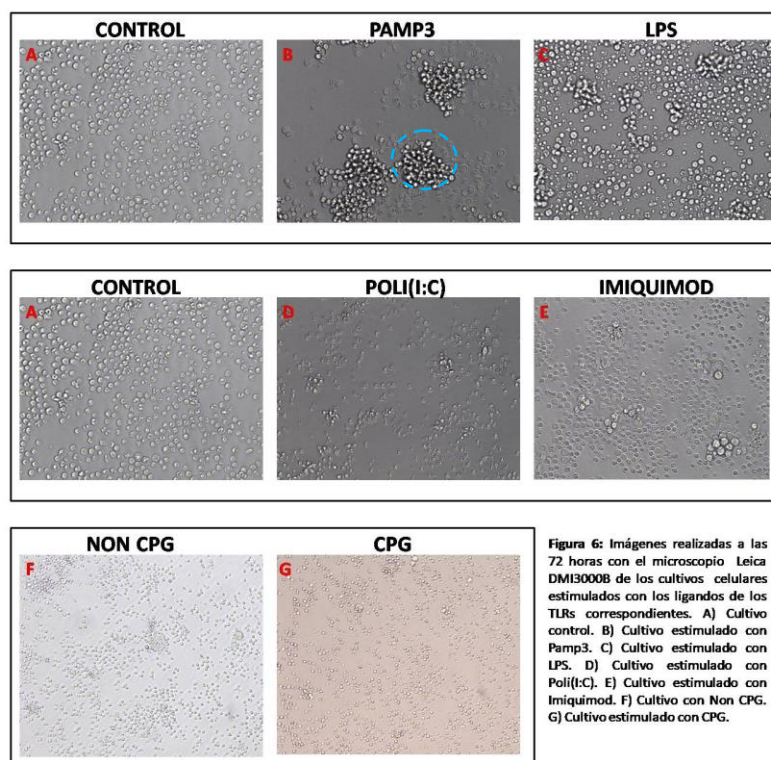
Por consiguiente, es importante destacar que la expresión de TLR3, TLR7 y TLR9 es muy alta en las células B1Rel (y algo menor en las B2) de los pulmones de neonatos, y tiende a disminuir con la edad. Por otro lado, la expresión en el bazo se mantiene similar en ambas etapas de la vida.

#### 4.2 Resultados del análisis *in vitro*: Viabilidad, proliferación y diferenciación

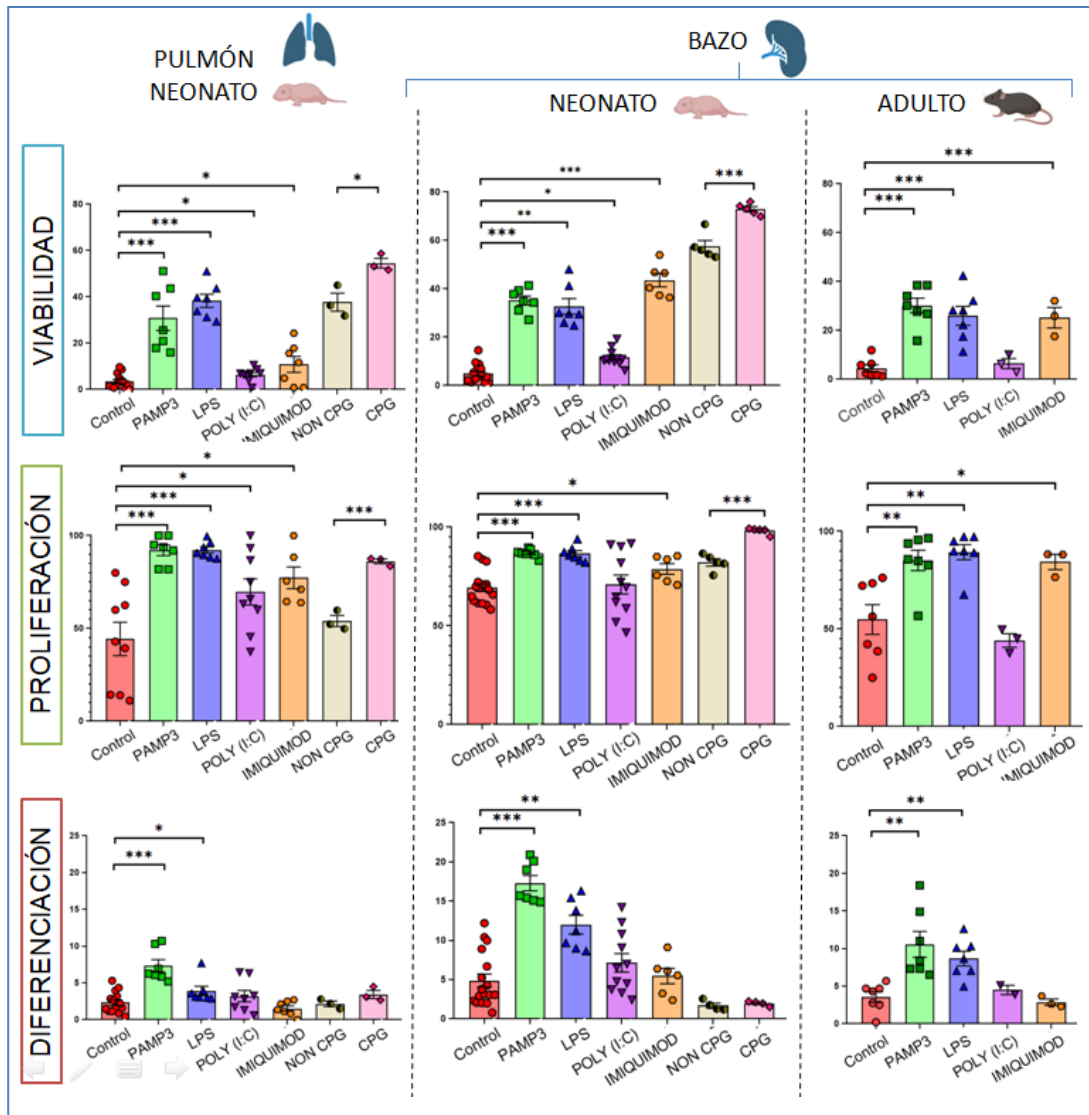
Para investigar la influencia de los TLRs en la proliferación, viabilidad y diferenciación hacia

células plasmáticas de la población B, llevamos a cabo cultivos celulares en los que estimulamos con ligandos específicos de TLR3 (POLI(I:C), TLR7 (imiquimod), TLR9 (CPG) y de TLR2 (PAMP3) y TLR4 (LPS) como controles positivos. Realizamos fotografías de estos cultivos a las 72 horas con microscopio Leica DMI3000B acoplado a una cámara Leica DF420 (leica, Wetzlar) que nos permitió obtener imágenes de los cultivos. Estas imágenes se muestran en la Figura 6 y los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 7.

En la Figura 6 podemos observar las diferencias entre los cultivos estimulados y el control que no lleva estímulo. La activación con ligandos de TLR2 y TLR4 extracelulares (PAMP3 y LPS, respectivamente) produce más cantidad de células y agregados que el control, y además detectamos células que han aumentado de tamaño. El cultivo estimulado con el ligando de TLR7 imiquimod también muestra agregados celulares, aunque en menor medida. Sin embargo, no se ven diferencias en los cultivos estimulados con POLI (I:C), NON CPG y CPG.



**Figura 6:** Imágenes realizadas a las 72 horas con el microscopio Leica DMI3000B de los cultivos celulares estimulados con los ligandos de los TLRs correspondientes. A) Cultivo control. B) Cultivo estimulado con PAMP3. C) Cultivo estimulado con LPS. D) Cultivo estimulado con POLI(I:C). E) Cultivo estimulado con Imiquimod. F) Cultivo con NON CPG. G) Cultivo estimulado con CPG. En azul está rodeado un ejemplo de agregado celular.



**Figura 7:** Representación en diagramas de barras de los porcentajes de viabilidad, proliferación y diferenciación a células plasmáticas de la población B tras estimularla con ligandos para los TLRs a estudiar. Cada punto representa una muestra (Pulmón neonato n=15, Bazo neonato n=19, adulto n=8). Las diferencias estadísticas se muestran como media + SEM \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

En nuestro estudio, utilizamos el término "viabilidad celular" para referirnos al porcentaje de células B vivas después de 72 horas de cultivo. Los resultados obtenidos en las gráficas muestran que en el pulmón neonatal la estimulación con los ligandos de los TLRs provocó un aumento significativo en la viabilidad celular de las células B en comparación con las células no estimuladas. Estos hallazgos confirman el papel de estos receptores en la mejora de la viabilidad celular en nuestro sistema de estudio. Además, se observó un patrón similar en las poblaciones de linfocitos B del bazo de neonatos, donde nuevamente se encontró que la estimulación de todos los TLRs tuvo un impacto en la viabilidad celular.

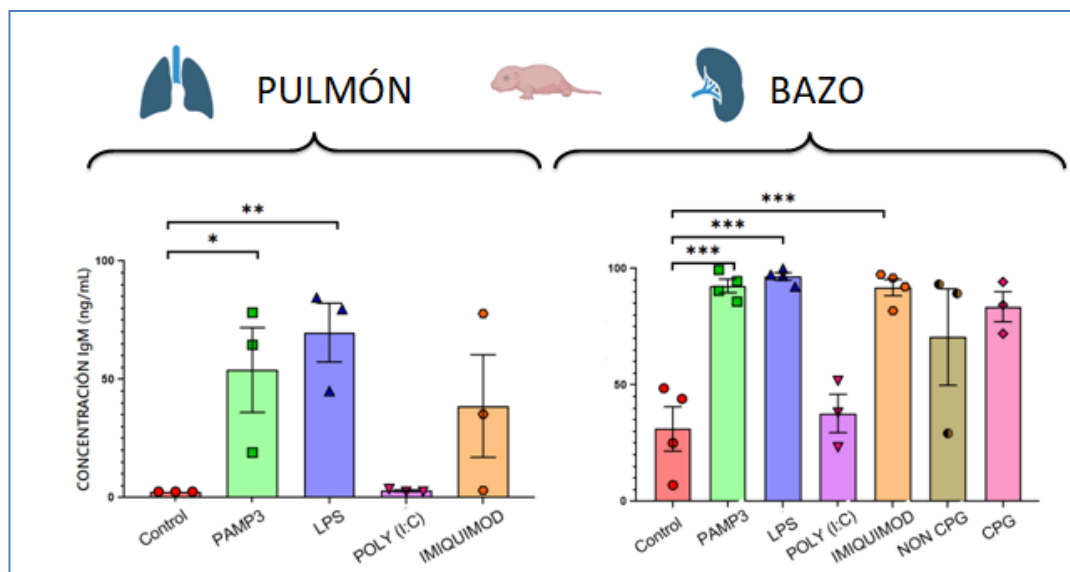
Sin embargo, en ratones adultos, se encontró que la estimulación de TLR7 afecta a la viabilidad, mientras que no se observó este efecto con TLR3. Observando el papel de TLR3 en los modelos neonatales, se encontró que tiene el menor efecto significativo, y parece que estos niveles disminuyen a medida que el ratón se hace adulto, hasta no mostrar diferencias con el control.

Con respecto a la proliferación de las células B, proceso mediante el cual un linfocito B progenitor se divide y da lugar a dos o más células hijas, nuestros resultados muestran como la estimulación de todos los TLRs, tanto los extracelulares como los intracelulares, provoca un aumento significativo de la proliferación de las células B de pulmón de neonato. Es decir, de nuevo, todos los TLRs intervienen en la proliferación de los linfocitos B presentes en el pulmón. En cambio, los datos obtenidos a partir de bazo neonato y adulto indican que TLR3 no provoca este aumento en la proliferación, manteniendo unos niveles similares al control.

Por último, nuestra investigación indica que la diferenciación a células plasmáticas no parece depender del papel de los TLRs intracelulares en las condiciones utilizadas. Únicamente encontramos un incremento de la diferenciación al estimular con PAMP3 y con LPS tanto en pulmón como en bazo. Por lo tanto, nuestros hallazgos respaldan las conclusiones de estudios anteriores, que indicaban que los TLRs extracelulares TLR2 y TLR4 desempeñan un papel positivo en la diferenciación de los linfocitos B desde las etapas tempranas de la vida hasta la edad adulta en el pulmón. Sin embargo, este fenómeno no se repite con los TLRs intracelulares en el contexto de la diferenciación a células plasmáticas.

#### **4.3 Producción diferencial de IgM en respuesta a agonistas de TLRs: ELISA de IgM total**

Para determinar si la estimulación de los TLRs presentes en la población B induce producción de inmunoglobulinas en los cultivos, se midieron los niveles de IgM totales mediante la técnica ELISA. Estos resultados se muestran en la Figura 8.



**Figura 8:** Representación en diagramas de barras de la concentración en ng/mL de IgM en los sobrenadantes de cultivos estimulados con los ligandos de los TLRs. Cada punto representa una muestra (Pulmón neonato n=3, Bazo neonato n=4). Las diferencias estadísticas se muestran como media + SEM \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que la estimulación de los TLRs extracelulares TLR2 y TLR4 en neonatos, tanto en el bazo como en el pulmón, aumenta la producción de IgM por las células B con respecto a las condiciones de no estimulación. Además, nuestros resultados muestran que los niveles de producción de IgM debido a la estimulación de estos TLRs son mayores en el bazo que en el pulmón.

Centrándonos en los TLRs intracelulares TLR3, 7 y 9, nuestros resultados solo muestran una producción significativa de IgM en la población B del bazo de neonatos después de la estimulación del TLR7 con su ligando Imiquimod. Por lo tanto, según nuestro estudio sobre la relación entre los TLRs y la producción de IgM, se indica que solo TLR7 en las células del bazo de neonatos, está involucrado en la producción de IgM por las células B.

## 5. DISCUSIÓN

Los TLRs son componentes fundamentales del sistema inmune innato, cuya función principal es la detección y protección frente a patógenos invasores. Esta familia de receptores está integrada por una serie de proteínas que desempeñan un papel muy importante en el reconocimiento y activación de respuestas inmunitarias apropiadas frente a la agresión de los agentes infecciosos<sup>25</sup>. Existen múltiples estudios que describen

las funciones de estos receptores en células mieloides, como macrófagos y células dendríticas<sup>26</sup>, pero se han realizado menos investigaciones sobre las respuestas de los linfocitos B a través de sus TLRs. Varias investigaciones demuestran la expresión de una amplia variedad de TLRs en las células B, y su activación por ligandos específicos provoca mejoras en la supervivencia celular y expresión de moléculas de superficie, así como en la producción de citoquinas y anticuerpos<sup>27</sup>.

Cuando la respuesta inmunitaria comienza, los linfocitos B reciben señales a través de los TLRs y de otros receptores como su receptor específico de antígeno o BCR. La estimulación simultánea de estos receptores va a potenciar tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa en las células B<sup>28-29</sup>. Actualmente, se conoce que los niveles de expresión de los receptores tipo Toll varían según el subconjunto de células B, su ubicación y estado de activación.

El laboratorio de inmunobiología del CNM ha identificado una nueva población de células B en ratón, denominada B1Rel. Esta subpoblación destaca por aparecer en los primeros momentos de vida en el bazo y tener características pseudoinnatas. La investigación sobre estas células ha demostrado que son capaces de responder a diversos estímulos de TLRs *in vitro*. Además, se ha descrito que los TLRs extracelulares 2 y 4, que se expresan en los linfocitos B1Rel presentes en pulmón de animales neonatos, son capaces de responder a estímulos microbianos aumentando la proliferación, viabilidad y diferenciación de estas células, contribuyendo así al mantenimiento de su homeostasis.

Basándonos en estos estudios previos, este Trabajo de Fin de Máster plantea como hipótesis que los TLRs intracelulares (3, 7 y 9) podrían estar implicados también en la homeostasis celular de las poblaciones B en el pulmón de ratones neonatos. Los TLR endosomales o intracelulares desempeñan un importante papel en la detección de ácidos nucleicos, lo que puede ser fundamental en la respuesta inmunitaria frente a los virus<sup>30</sup>. La estimulación simultánea de estos receptores con el complejo BCR-antígeno aporta a los linfocitos B la capacidad de reconocer y responder eficientemente a una amplia gama de virus<sup>31</sup>.

Se ha comprobado que cuando el pulmón se expone a patógenos o señales de peligro, sus células mieloides, estromales y linfocitos B expresan TLRs que reconocen dichos peligros y desencadenan eventos de señalización para la defensa del organismo. Esta señalización no solo es importante contra infecciones microbianas, sino que también es relevante en

trastornos pulmonares no infecciosos (lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar intersticial, asma o EPOC). Además, se ha descrito que esta señalización juega un papel relevante en el cáncer de pulmón<sup>32</sup>.

La mayoría de subpoblaciones B en ratones expresan los receptores TLR 1, 2, 4, 6, 7 y 9. Sin embargo, el receptor TLR3 se encuentra en niveles más bajos y generalmente está restringido a las células B de la zona marginal (MZB)<sup>33-34</sup>. Nuestro estudio confirma estos resultados en bazo, tanto de ratones adultos como neonatos, donde se encontró que TLR3 es el receptor que menos se expresa en las células B2 y B1Rel, mientras que TLR7 se expresa en mayor medida y TLR9 muestra la expresión más alta en todos los casos estudiados. Por el contrario, el pulmón neonatal expresó niveles más altos de TLR3 y TLR7 en las células B, especialmente en las células B1Rel, y estos niveles disminuyen en el ratón adulto. Estos resultados sugieren que la expresión de los receptores TLR en las células B puede variar según el tejido y la edad del ratón.

En resumen, los resultados obtenidos en el análisis *ex vivo* del marcaje intracelular de TLR3, TLR7 y TLR9, mostraron que la expresión de estos TLRs intracelulares es muy alta en las células B1Rel y B2 de los pulmones de neonatos, y tiende a disminuir a medida que pasa el tiempo. Por el contrario, al compararlo con un órgano inmunitario secundario como el bazo, observamos que la expresión de estos TLRs se mantiene de manera similar en ambas etapas de la vida, siendo los linfocitos B del pulmón del neonato los que exhiben la mayor expresión de TLRs intracelulares.

Estos resultados muestran una regulación y cambio de expresión de TLRs intracelulares en los linfocitos B del pulmón (B2 y B1Rel) a lo largo del desarrollo, resaltando la necesidad de entender el rol de los TLRs en las respuestas inmunitarias pulmonares en diferentes etapas de la vida y su implicación en enfermedades pulmonares y diseño de nuevas terapias dirigidas a dichas células y sus receptores.

Varios estudios señalan que los linfocitos B de ratón responden de manera más favorable a la estimulación de sus TLRs, en comparación con los linfocitos humanos. Se ha comprobado que cuando un ligando específico se une al TLR, las células B de ratón y de humano, aumentan su viabilidad, proliferación, producción de citoquinas y anticuerpos<sup>35-36</sup>. Por ejemplo, un estudio reciente muestra que las células B activadas por CD40 y TLR4 o TLR9 aumentan su proliferación y producción de amplias cantidades de Ig, en cambio este efecto disminuye si tan solo son estimuladas por CD40<sup>37</sup>. Además, la estimulación de



linfocitos B naive induce la diferenciación celular en células plasmáticas<sup>38-39</sup> y promueve el desarrollo de células de la zona marginal, transicionales y B1 de ratón en células productoras de anticuerpos<sup>40-41</sup>.

Nuestro estudio demuestra que los receptores intracelulares tienen la capacidad de incrementar la viabilidad y proliferación de las células B en el pulmón neonatal. Entre estos receptores, se observa que TLR9 es el que más potencia estos parámetros, seguido por TLR7, y en última instancia, TLR3, siguiendo la misma tendencia que sus niveles de expresión en estas células. Por otro lado, no se observó que ningún receptor intracelular interfiriera en la diferenciación de esta población hacia células plasmáticas. Esta función parece estar restringida a los receptores tipo Toll extracelulares como TLR2 y TLR4.

Las últimas investigaciones destacan el importante papel que pueden desempeñar los ligandos de los TLRs como adyuvantes en vacunas<sup>42</sup>. Estudios iniciales se basaron en los ligandos de los TLR intracelulares 7, 8 y 9. Por ejemplo, el imiquimod, imidazoquinolina no nucleósido, ligando de TLR7, ha sido empleado en el tratamiento de verrugas genitales externas, queratosis actínica y carcinoma basocelular superficial<sup>43</sup>. Por otro lado, vacunas que utilizan ligandos de TLR3 y TLR9 como adyuvantes están actualmente en ensayos clínicos de fase III<sup>44,45</sup>. Generalmente, estos adyuvantes se están desarrollando para tener como diana a células dendríticas presentadoras de antígenos. Sin embargo, como ya hemos destacado a lo largo de este trabajo, es importante tener en cuenta que los linfocitos B también expresan receptores de TLR y su función es necesaria para el desarrollo de una buena respuesta inmune. Además, el empleo de estos ligandos es una estrategia innovadora en inmunoterapia contra la alergia. Actualmente, se están desarrollando dos vacunas antialérgicas con antagonistas de TLRs que están en fase de ensayo clínico, una a base de MPLA (agonista de TLR4) y la otra con CpG (ligando de TLR9)<sup>46</sup>.

La utilización de los agonistas de los TLRs como adyuvantes en el desarrollo de vacunas tiene varias ventajas. Por ejemplo, su mecanismo de acción es conocido y son capaces de estimular la inmunidad innata y adaptativa, interfiriendo en la maduración de células dendríticas, generando inmunidad en las mucosas e interfiriendo en la proliferación de linfocitos B. Además, estos agonistas se pueden administrar tanto por vía parenteral como intranasal, ampliando las opciones de administración y facilitando su uso clínico<sup>47</sup>.

Como ya hemos mencionado, la activación de los TLRs influye en la producción de

inmunoglobulinas en los linfocitos B. La producción de inmunoglobulinas mediadas por TLRs es similar en células B murinas que humanas. Se ha comprobado que para que esta producción sea significativa se necesitan señales adicionales a través de otros receptores como BCR, CD40 o BAFFR<sup>48</sup>.

Experimentos realizados *in vivo* sugieren que la activación de células B inmaduras por agonistas de TLRs provoca una rápida división, proliferación y secreción de IgM, IgG o IgA por parte de estas células<sup>49</sup>. Además, se ha comprobado que también pueden favorecer el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas secretadas. Varios estudios demuestran que las células B de ratón estimuladas con LPS (ligando de TLR4) y CPG (ligando de TLR9) son capaces de segregar tanto IgM como IgG, mientras que la activación de TLR2 promueve sobretodo la producción de IgA, inmunoglobulina que juega un papel importante en la inmunidad de las mucosas<sup>50</sup>. Otros ligandos de TLRs también son capaces de inducir la producción de anticuerpos en las células B de ratón. POLI I:C (ligando de TLR3) aumenta la producción de IgG e IgA y Flagelina (ligando de TLR5) promueve la secreción de IgA<sup>51-52</sup>. Por último, un estudio realizado en ratones señala que la administración diaria intranasal de imiquimod (ligando de TLR7) previene la inflamación pulmonar y de las vías respiratorias, así como la replicación viral y la pérdida de peso tras estimular el aumento de diversos isotipos de inmunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgG, IgE e IgM)<sup>53</sup>.

Nuestro estudio ha cuantificado la producción de IgM por los linfocitos B tras la estimulación de sus TLRs. Los resultados que hemos obtenido muestran que los linfocitos B de pulmón neonatal solo aumentan la producción de IgM en presencia de PAMP3 (ligando de TLR2) y LPS (ligando de TLR4), mientras que los TLRs intracelulares no parecen interferir en la producción de IgM. Sin embargo, en las células B del bazo, se encontró una producción significativa de IgM después de la estimulación con imiquimod.

Para finalizar, es importante destacar que los TLRs y sus ligandos se han convertido en dianas de investigación terapéutica debido a su potencial uso en enfermedades infecciosas, alérgicas y cáncer<sup>54</sup>. En línea con esto, nuestro estudio ha demostrado la influencia de los TLRs intracelulares en el mantenimiento y la homeostasis de las células B en el pulmón de modelos neonatales de ratón, respaldando así nuestra hipótesis inicial. Estos hallazgos brindan información importante sobre el papel de los TLRs en la respuesta inmunitaria y su potencial implicación en el desarrollo de estrategias terapéuticas.

## 6. CONCLUSIONES

1. Las diferentes poblaciones B estudiadas (linfocitos B2 y B1Rel) expresan TLR intracelulares (TLR3, 7 y 9) en pulmón neonatal, siendo TLR9 el más expresado, seguido de TLR7 y por último TLR3. El bazo neonatal también expresa estos TLRs pero a niveles más bajos.
2. La expresión de estos TLRs parece disminuir en ratón adulto, ya que los resultados obtenidos en pulmón adulto muestran niveles de expresión significativamente inferiores. Sin embargo los resultados obtenidos en bazo adulto son similares a los observados en neonatos.
3. La estimulación a través de los TLRs intracelulares (TLR3, 7 y 9) aumenta la viabilidad y proliferación de las células B, pero no su diferenciación a células plasmáticas. Esta función parece estar restringida a los TLRs extracelulares (TLR2 y 4).
4. La producción de IgM tras la estimulación por los TLRs intracelulares no varía en células B de pulmón neonatal. Por el contrario sí observamos este efecto con la estimulación con imiquimod (ligando de TLR7) en las células B de bazo neonatal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004 Feb;16(1):3-9.
2. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):453-60.
3. Chen JQ, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016 Feb;50(1):1-17.
4. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):1-14.
5. Anthony N, Foldi I, Hidalgo A. Toll and Toll-like receptor signalling in development. *Development*. 2018 Apr;25,45(9).
6. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353-64.
7. Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jan;1,5(1).
8. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):305-15.
9. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014 Aug;14(8):546-58.
10. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637-50.
11. Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS. Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. *Antibodies (Basel)*. 2020 Oct13;9(4):53.
12. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol*. 2013 Mar;10(2):103-6.
13. Shen P, Lampropoulou V, Stervbo U, Hilgenberg E, Ries S, Mecqinon A, Fillatreau S. Intrinsic Toll-like receptor signalling drives regulatory function in B cells. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jan1;5(1):78-86.
14. Rincón-Vásquez N, Jaramillo P, Ilanos CM. Morphology and immunophenotype of plasma cells in multiple myeloma. *Medicine & lab*. 2017 Oct14;23(9):443-458.
15. Flores-Montero J, De Tute R, Paiva B, perez JJ, Bottcher s, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. Mieloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple mieloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;

16. Tung JW, Herzenberg LA. Unrevealing B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol*. 2007 19(2):150-155.
17. De Andrés B, Prado MC, Palacios B, Alía M, Jagtap S, Serrano N, Cortegano I, Gaspar ML. Dynamics of the Splenic Innate-like CD19<sup>+</sup> CD45Rlo Cell Population from Adult Mice in Homeostatic and Activated Conditions. *J Immunol*. 2020 Jul1;189(5):2300-2308.
18. Cortegano I, Rodríguez M, Martín I, Prado MC, Ruíz C, Hortigüela R, Alía M, Vilar M, Mira H, Cano E, Domínguez M, de Andrés B, Gaspar ML. Altered marginal zone and innate-like B cells in aged senescence-accelerated SAMP8 mice with defective IgG1 responses. *Cell Death Dis*. 2017 Aug17;8(8).
19. De Andrés B, Cortegano I, Serrano N, Del Rio B, Martín P, Gonzalo P, Marcos M, Gaspar ML. A Population of CD19<sup>high</sup>CD45R<sup>-/low</sup>CD21<sup>low</sup> B Lymphocytes Poised for Spontaneous Secretion of IgG and IgA Antibodies. *J Immunol*. 2007 Oct15;179(8):5326–5334.
20. Montero Vega MT, de Andrés Martín A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. *Allergol Immunopathol*. 2008 Dec;36(6):347-57.
21. Barr TA, Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2007 Nov 37(11):3040-53.
22. Ruiz Sánchez C. Expresión y funcionalidad de TLR2 y TLR4 en las poblaciones linfomieloides presentes en el pulmón y órganos linfoides durante la vida embrionaria y neonatal en modelos de ratón [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2022.
23. Kumar V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury. *Front Immunol*. 2020 Aug4;1722(11).
24. Kato A, Hulse KE, Tan BK, Schleimer RP. B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131(4):933-57.
25. Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol*.

- 2018 Jan2;37(1):20-36.
26. Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res.* 2010 Jan5;11(1):2.
  27. Buchta CM, Bishop GA. Receptores tipo Toll y células B: funciones y mecanismos. 2014 Aug;59(1-3):12-22.
  28. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):332–8.
  29. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol.* 1999;162(12):7198–207.
  30. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol.* 2010 Jan;20(1):4-22.
  31. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol.* 1999 Jun15;162(12):7198-207.
  32. Arora S, Ahmad S, Irshad R, Goyal Y, Rafat S, Siddiqui N, Dev K, Husain M, Ali S, Mohan A, Syed MA. TLRs in pulmonary diseases. *Life Sci.* 2019 Sep15;233:116671.
  33. Gururajan M, Jacob J, Pulendran B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS ONE.* 2007;2(9):863.
  34. Genestier L, et al. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol.* 2007;178(12):7779–86.
  35. Xu W, et al. Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J Immunol.* 2008;181(1):276–87.
  36. Wang Z, et al. Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol.* 1997;180(2):162–7.
  37. Adjobimey T, et al. Co-activation through TLR4 and TLR9 but not TLR2 skews Treg-mediated modulation of Igs and induces IL-17 secretion in Treg: B cell co-cultures. *Innate Immun.* 2014;20(1):12–23.
  38. Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically

- programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol.* 2009;182(2):890–901.
39. Ueda Y, et al. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol.* 2007;178(6):3593–601.
  40. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol.* 1999;162(12):7198–207.
  41. Meyer-Bahlburg A, Khim S, Rawlings DJ. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J Exp Med.* 2007;204(13):3095–101.
  42. Weeratna RD, et al. TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine.* 2005;23(45):5263–70.
  43. Vidal D. Topical imiquimod: mechanism of action and clinical applications. *Mini Rev Med Chem.* 2006;6(5):499–503.
  44. Sogaard OS, et al. Improving the immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults with a toll-like receptor 9 agonist adjuvant: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2010;51(1):42–50.
  45. Halperin SA, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine.* 2006;24(1):20–6.
  46. Kirtland ME, Tsitoura DC, Durham SR, Shamji MH. Toll-Like Receptor Agonists as Adjuvants for Allergen Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020 Nov12;11:599083.
  47. Buchta CM, Bishop GA. TRAF5 negatively regulates TLR signaling in B lymphocytes. *J Immunol.* 2014;192(1):145–50.
  48. Agrawal S, Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol.* 2011;31(1):89–98.
  49. Capolunghi F, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol.* 2008;180(2):800–8.
  50. Ueda Y, et al. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J*

- Immunol.* 2007;178(6):3593–601.
51. He B, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine. *Immunity.* 2007 Apr 26(6):812–26.
  52. Gerth AJ, Lin L, Peng SL. T-bet regulates T-independent IgG2a class switching. *Int Immunol.* 2003;15(8):937–44.
  53. Erlich J, Liong F, Luong R, Liong S, Bozinovski S, Seow HJ, O'Leary JJ, Brooks DA, Vlahos R, Selemidis S. Intranasal and epicutaneous administration of Toll-like receptor 7 (TLR7) agonists provides protection against influenza A virus-induced morbidity in mice. *Sci Rep.* 2019 Feb20;9(1):2366.
  54. Vadillo E, Camacho R. Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *RIC.* 2012 Sep64(5):461-476.



## 8. AGRADECIMIENTOS

En el cierre de este emocionante y enriquecedor capítulo de mi vida académica, me veo en la necesidad de expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han creído en mí y me han impulsado a alcanzar mis metas, vuestro apoyo y dedicación han sido imprescindibles para sacar este trabajo adelante. Gracias de ante mano por vuestra paciencia y cariño.

A mis tutoras, Carolina Ruiz e Isabel Cortegano, les agradezco su dedicación y compromiso conmigo y con este trabajo. Vuestra experiencia, conocimientos y paciencia como tutoras han sido fundamentales en el desarrollo de mi TFM. Os agradezco haberme ofrecido esta oportunidad que me ayudará para encaminar mi futuro profesional.

A todos los trabajadores del departamento de inmunobiología, agradezco vuestra amabilidad y disposición, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado y enseñarme como se desarrolla el día a día de un equipo de laboratorio.

A mis compañeros, estoy agradecida de haber podido vivir este viaje a vuestro lado. He aprendido mucho durante estos meses con vosotros, espero que nuestros caminos sigan cruzándose en el futuro.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a las personas que han confiado en mí y en mi trabajo desde siempre. A mi familia y amigos, gracias por vuestro amor y apoyo constante, gracias por permanecer a mi lado en todos los momentos que recuerdo y celebrar mis logros como propios, os quiero.