



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de postgrado

# **Los linfocitos B residentes del timo sufren una diferenciación homeostática hacia células de memoria**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al grado de

## **Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad De Ciencias  
Universidad de Chile  
Por

**Justine Scarlet Castañeda Villatoro**

Directora de Tesis  
**Dra. María Rosa Bono**

Co-Directora de Tesis  
**Dra. Sarah Núñez Clausen**

**Santiago – Chile  
2022**



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de postgrado

## INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas presentada por la candidata

**Justine Scarlet Castañeda Villatoro**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de noviembre, 2022

**Dra. María Rosa Bono**

Directora de Tesis

---

**Dra. Sarah Núñez Clausen**

Co-Directora de Tesis

---

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Álvaro Glavic

---

Dr. Francisco Chávez

---

Santiago de Chile, 2022

## BIOGRAFÍA



Nací un 22 de marzo de 1995, en Santiago de Chile. Desde siempre, los ramos relacionados con las ciencias fueron mis favoritos hasta que, en la educación media, gracias al profesor Julio de biología y química, descubrí que me quería dedicar totalmente a la ciencia y ser científica. Debido a esto, entre a estudiar bioquímica en la Universidad de Santiago de Chile (USACH) y en los años de la carrera me enamoré de la inmunología y la neurociencia. Dado esto, cuando tuve que realizar mi tesis de pregrado, busqué laboratorios en ambas áreas y me decidí por el laboratorio de Inmunología, a cargo de la Dra. Bono, y así fue como comencé mi carrera en investigación.

Me gustó tanto la inmunología, que el año 2019 entré al programa de magister en ciencias biológicas de la Universidad de Chile, para realizar mi tesis de magister en el mismo laboratorio a cargo de las Dra. Bono y Dra. Núñez durante el periodo de pandemia, quienes me han guiado todos estos años en la investigación.

*A mis padres y hermanas,  
por todo su apoyo y amor <3*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y ayudado de alguna manera durante esta etapa. Primero, agradecer a toda mi familia, pero principalmente a mis padres, que me han apoyado en todo momento; y a mis hermanas, por todo el apoyo, sostén y cariño que me han brindado.

Agradezco enormemente a toda la gente del inmunolab que me ha acogido durante todos estos años. A mi tutora, Dra. María Rosa Bono, por aceptarme y guiarme desde mi tesis de pregrado. No menos importante, a la Dra. Sarah Núñez, por aceptarme y motivarme a crecer como investigadora, enseñarme a trabajar en mesón y por todo el conocimiento que me ha entregado, lo que me ha motivado a ir mejorando cada vez más. Muchas gracias por todas las correcciones y críticas en este trabajo, que, sin ello, no sería ni un 10% de como quedó. Además, quiero agradecer a la Dra. Daniela Sauma y al Dr. Mario Rossemblatt, por todas sus acotaciones cuando mostraba los resultados en las reuniones. También, quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio: Nicolás, Moira, Sol, JP, Lily, Pauli, Felipe, José, Eva, Pame y a Leo. A Vale, por siempre tener tan buena disposición para enseñar/explicar/ayudar en todo lo relacionado con la citometría. A Pedro y Brian, aunque ya no pertenecen al laboratorio, fueron una parte importante durante todo el magíster.

Finalmente, quisiera agradecer a las instituciones que financiaron este trabajo: a los proyectos FONDECYT 11221128 (SN), FONDECYT 1191438 (MB), FONDECYT 1220196 (DS), y ANID/BASAL/FB210008 (MR). También a la beca de financiamiento para mis estudios de magister CONICYT/Magister-nacional/2020/22201364 (JC).

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Inmunidad adaptativa y memoria inmunológica .....	1
1.2 Activación de la respuesta inmune humoral y generación de linfocitos B de memoria .....	2
1.3 Fenotipo y localización de los linfocitos B de memoria .....	5
1.4 El timo contiene una población inusual de linfocitos B residentes.....	9
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general .....	15
3.2 Objetivos específicos .....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Materiales.....	16
4.1.1 Ratones .....	16
4.1.2 Anticuerpos para citometría de flujo.....	17

4.1.3 Antibióticos .....	17
4.2 Métodos.....	18
4.2.1 Aislamiento de células de bazo, timo, ganglio mesentérico, y placas de Peyer .....	18
4.2.2 Análisis de moléculas de superficie por citometría de flujo.....	19
4.2.3 Cirugía de parabiosis.....	20
4.2.4 Tratamiento con antibióticos perinatal .....	20
4.2.5 Cuantificación de bacterias mediante citometría de flujo .....	21
4.2.6 Análisis estadístico .....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 El timo contiene una proporción significativa de linfocitos B que han realizado cambio de isotipo de inmunoglobulina .....	24
5.2 Los linfocitos B del timo expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2 .....	28
5.3 Los linfocitos B adquieren el fenotipo de cambio de clase de manera local en el timo.....	38
5.4 Los linfocitos B de memoria tímicos no dependen significativamente de la exposición a antígenos externos .....	41
5.5 La diferenciación de los linfocitos B tímicos comienza en la etapa neonatal y antecede a la formación de linfocitos B de memoria en la periferia.....	54

5.6 La acumulación progresiva de los linfocitos B de memoria en la periferia durante el envejecimiento no se ve reflejada en el timo.....	57
5.7 La interacción entre los linfocitos B y T modula la adquisición del fenotipo de memoria en los linfocitos B tímicos .....	63
6. DISCUSIÓN.....	68
RESUMEN DE RESULTADOS.....	79
7. CONCLUSIÓN.....	80
FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	83
PUBLICACIONES.....	94



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Los linfocitos B tímicos presentan un fenotipo de cambio de clase, y expresan las inmunoglobulinas IgG2b e IgA..... 27
- Figura 2.** Subpoblaciones de linfocitos B tímicos expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2..... 29
- Figura 3.** Los linfocitos B IgM y de cambio de clase expresan en mayor proporción los marcadores de memoria CD73 y PD-L2..... 31–32
- Figura 4.** El timo contiene una alta frecuencia de linfocitos B que expresa el marcador de centro germinal GL7<sup>+</sup>..... 34
- Figura 5.** Los linfocitos B tímicos de ratones BALB/cj presentan una alta frecuencia de cambio de clase a IgG2b e IgA..... 36
- Figura 6.** Los linfocitos B tímicos de ratones BALB/cj expresan marcadores de memoria CD73 y PD-L2..... 37
- Figura 7.** Los linfocitos B sufren cambio de clase de inmunoglobulina a través de un proceso local en el timo..... 39–40
- Figura 8.** El tratamiento con antibióticos desde el desarrollo perinatal reduce el número de bacterias comensales en heces..... 42
- Figura 9.** Reducción del número de células totales en las placas de Peyer y ganglio mesentérico en respuesta a la disminución de los antígenos intestinales provenientes de la microbiota..... 44

<b>Figura 10.</b> La frecuencia y el número de los linfocitos B tímicos totales no se ven afectados por la reducción en la microbiota.....	45
<b>Figura 11.</b> La reducción de la microbiota intestinal produce una disminución del número de los linfocitos B con cambio de clase totales en el ganglio mesentérico y en las placas de Peyer.....	47
<b>Figura 12.</b> Cambios en la frecuencia y del número de los linfocitos B IgG2b <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> en bazo, MLN, placas de Peyer, y timo en respuesta a la reducción de microbiota intestinal.....	48–49
<b>Figura 13.</b> La reducción de microbiota intestinal no afecta el número de los linfocitos B de memoria que expresan CD73 y PD-L2 en el timo.....	51–53
<b>Figura 14.</b> Los linfocitos B tímicos IgG2b <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> son detectados en los primeros días de vida.....	56
<b>Figura 15.</b> Los linfocitos B tímicos IgG2b <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> no se acumulan durante el envejecimiento.....	58
<b>Figura 16.</b> El número de linfocitos B tímicos B220 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> disminuyen en ratones viejos.....	60
<b>Figura 17.</b> La frecuencia de los linfocitos B tímicos que expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2 disminuyen durante el envejecimiento.....	62
<b>Figura 18.</b> El cambio de clase de los linfocitos B tímicos requiere la interacción de los linfocitos B con los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> inmaduros.....	65

<b>Figura 19.</b> La interacción entre los linfocitos B y los timocitos promueve la diferenciación de los linfocitos B tímicos a células IgG2b <sup>+</sup> e IgA <sup>+</sup> .....	66
<b>Figura 20.</b> Los linfocitos B tímicos de ratones OT-II presentan una disminución en la diferenciación de memoria basada en la expresión de CD73 y PD-L2.....	67
<b>Figura 21.</b> Modelo propuesto de la formación de linfocitos B de memoria tímicos.....	69
<b>Figura suplementaria 1.</b> Los linfocitos B IgM <sup>+</sup> de bazo son principalmente linfocitos B de zona marginal y CD21/35 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup> .....	81
<b>Figura suplementaria 2.</b> Los linfocitos B IgM <sup>+</sup> de timo no presentan linfocitos B de zona marginal y CD21/35 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup> .....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análisis de varianza

APC: Allophycocyanin

APC Cy7: Allophycocyanin Cy7

BCR: B cell receptor

BV: Brilliant violet

CD: Cluster of differentiation

FACS: Fluorescence activated cell sorting

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

Ig: inmunoglobulina

MHC-II: complejo de histocompatibilidad de clase II

MLN: mesenteric lymph node

PBS: phosphate buffered saline

PDL2: ligando de muerte programada 2

PE: Phycoerythrin

PE Cy7: Phycoerythrin Cy7

PI: yoduro de propidio

PP: Peyer's Patches

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SFB: suero fetal bovino

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformador  $\beta$

TCR: T cell receptor

## RESUMEN

El timo contiene una población de linfocitos B que participa en la maduración y selección de los linfocitos T. Estudios recientes y antecedentes de nuestro laboratorio muestran que, de manera basal, los linfocitos B tímicos de ratones que no han sido inmunizados poseen elevada expresión de moléculas de activación y aproximadamente un tercio de ellos ha realizado cambio de isotipo de inmunoglobulina (Ig). Si bien, la activación y cambio de clase de Ig son procesos clásicamente asociados a la diferenciación de linfocitos B de memoria en respuesta a antígenos extraños en la periferia, no es claro si los linfocitos B en el timo recapitulan las propiedades fenotípicas de linfocitos B de memoria convencionales y si su diferenciación sigue la vía clásica de activación en respuesta a antígenos exógenos.

En este trabajo, nos propusimos evaluar el fenotipo de los linfocitos B del timo en distintos contextos para dilucidar el proceso de formación de los linfocitos B de memoria tímicos. Para cumplir este objetivo, analizamos la expresión de moléculas asociadas con el fenotipo de linfocitos B de memoria periféricos. Nuestros resultados muestran que, de manera basal, una proporción significativa de los linfocitos B del timo realizan cambio de clase a los isotipos IgG2b e IgA, y expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2. Interesantemente, en un modelo de parabiosis encontramos que una fracción de los linfocitos B circulantes que migran al timo realizan cambio de clase de Ig recapitulando el fenotipo de los

linfocitos B residentes. Dado que esto sugiere que la formación de linfocitos B de memoria ocurre localmente en el timo sin requerir estímulos antigénicos externos, evaluamos si un contexto de exposición reducida a antígenos externos afecta la formación de los linfocitos B de memoria en el timo. Para ello, generamos ratones con microbiota intestinal reducida mediante la administración de antibióticos desde el desarrollo perinatal. Observamos que el número de linfocitos B de memoria con cambio de clase disminuyen significativamente en el bazo y en los órganos linfoides asociados al intestino mientras que en el timo no se ven significativamente afectadas estas poblaciones. Siguiendo esta línea, también evaluamos si la cinética de aparición de los linfocitos B de memoria tímicos está correlacionada con la formación de memoria en órganos linfoides periféricos. Importantemente, observamos que, en el timo, los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> aparecen tempranamente durante los primeros días de vida, mientras que en el bazo comienzan a aparecer en etapas más tardías de desarrollo. Interesantemente, en el modelo murino OT-II –en el cual no ocurre interacción entre los linfocitos B y linfocitos T inmaduros– la diferenciación de linfocitos B de memoria tímicos se ve drásticamente reducida. En conjunto, los resultados de este trabajo aportan evidencia de un proceso atípico en el cual una fracción de los linfocitos B en el timo poseen un fenotipo de memoria de manera local en un proceso que requiere la interacción con linfocitos T inmaduros y es independiente de la activación de los linfocitos B periféricos frente antígenos externos.

## ABSTRACT

The thymus contains a population of resident B cells that participate in the maturation and selection of T cells. Recent studies and results from our laboratory show that, in a steady-state condition, thymic B cells from non-immunized mice have a high expression of activation molecules, and approximately a third of them have undergone an immunoglobulin (Ig) class switch. While activation and Ig-class-switching are processes typically associated with memory B cell differentiation in response to foreign antigens in the periphery, it is unclear if B cells in the thymus recapitulate the phenotypic properties of conventional memory B cells and if their differentiation follows the classical pathway of activation in response to exogenous antigens.

In this work, our main goal was to evaluate the phenotype of thymic B cells in different contexts to elucidate the formation of thymic memory B cells. For this aim, first we analyzed the expression of molecules that have been associated with the phenotype of peripheral memory B cells. Our results show that, at steady-state condition, a significant proportion of thymic B cells have undergone class-switching to the IgG2b and IgA isotypes and express the memory markers CD73 and PD-L2. Interestingly, in a parabiosis model, we found that a similar fraction of circulating B cells that migrate to the thymus undergo Ig class switching, recapitulating the phenotype of resident B cell. Since this suggests that memory B cell differentiation occurs locally in the thymus without requiring external

antigenic stimuli, we evaluated whether a context of reduced exposure to external antigens affects the formation of memory B cells in the thymus. For this, we generated mice with reduced intestinal microbiota by administering antibiotics from the perinatal development. We observed that the number of Ig-class-switched memory B cells is significantly decreased in the spleen and gut-associated lymphoid organs, while these populations are not significantly affected in the thymus. Similarly, we also evaluated whether the kinetics of appearance of thymic memory B cells is correlated with memory formation in peripheral lymphoid organs. Importantly, we observed that, in the thymus, IgG2b<sup>+</sup> and IgA<sup>+</sup> B cells appear early during the first days of life, while in the spleen they begin to appear at later stages of development. Interestingly, in the OT-II mouse model –in which interaction between thymic B cells and cognate immature CD4<sup>+</sup> T cells is abrogated– the differentiation of thymic memory B cells is drastically reduced. Altogether, our results provide evidence that the thymus supports an atypical process in which a fraction of resident B cells in the thymus acquire a memory phenotype locally, through the interaction with developing T cell that is independently of the activation of peripheral B cells against external antigens.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Inmunidad adaptativa y memoria inmunológica

Los linfocitos B y los anticuerpos que producen en respuesta a antígenos externos, son los componentes fundamentales de la inmunidad adaptativa humoral, otorgando protección al organismo frente diversos tipos de patógenos. Una de las cualidades más importantes de la inmunidad adaptativa, tanto de los linfocitos B y T, es su capacidad para “recordar” nuestro historial de exposición a antígenos, ya sea por infección o vacunación, por medio de la formación de células de memoria que proveen una inmunidad específica de larga duración (Abbas et. al, 2014). Este trabajo está centrado en estudiar a una población de linfocitos B localizados en el timo, ya que estudios recientes sugieren que sufren un proceso de diferenciación hacia células de memoria distinto al contexto convencional en respuesta a antígenos externos. Durante los últimos años se ha descrito que los linfocitos B tímicos presentan un fenotipo basalmente activado y una fracción de ellos realiza cambio de isotipo de inmunoglobulina (Ig) en condiciones homeostáticas, sugiriendo que existe una vía de activación no convencional para llevar a cabo su función en el timo presentando un fenotipo de encuentro con antígenos y por consiguiente, posiblemente ser una población de memoria (Perera et al., 2013; Yamano et al., 2015). Es por ello que se requiere entender el proceso de diferenciación de los linfocitos B en el timo hacia una

población de memoria y evaluar si ocurre de manera clásica en respuesta a su activación por antígenos externos.

## **1.2 Activación de la respuesta inmune humoral y generación de linfocitos B de memoria**

La respuesta adaptativa humoral comienza cuando antígenos externos son capturados y transportados a las zonas foliculares de los órganos linfoides secundarios, donde son reconocidos por los linfocitos B *naive* (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>). Los linfocitos B reconocen antígenos específicos por medio de su BCR (*B cell receptor*), también llamado inmunoglobulina de superficie, en combinación con otros estímulos, como el sistema del complemento y el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (Cyster & Allen 2019). Las etapas siguientes de activación varían dependiendo de la naturaleza del antígeno que activa al linfocito B, dado que antígenos proteicos inducen una respuesta dependiente de linfocito T (T-dependiente), mientras que antígenos no proteicos inducen una respuesta independiente de linfocito T (T-independiente) (Liao et al. 2017). Dado que este trabajo se enfoca en un proceso asociado a la respuesta T-dependiente, a continuación, se describirán en detalle sus etapas. En la respuesta humoral T-dependiente, de forma paralela a la activación inicial de los linfocitos B, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *helper* (o cooperadores) son activados en la zona T del órgano linfoide por células dendríticas que han capturado, procesado y presentado péptidos derivados del mismo antígeno en moléculas de

histocompatibilidad de clase II (MHC-II). La activación inicial de linfocitos B y T específicos en respuesta al mismo antígeno induce, en ambos tipos celulares, cambios en la expresión de receptores quimiotácticos que les permite migrar el uno hacia el otro e interactuar en el borde del folículo. A continuación, el linfocito B, que ha internalizado y procesado el antígeno proteico, presenta múltiples péptidos del antígeno en complejos péptido/MHC-II que son reconocidos por el TCR de un linfocito T cooperador previamente activado. Al ser activado, los linfocitos T proveen señales de ayuda mediante la expresión del ligando de CD40 (CD40L), que se une a su receptor, CD40, situado en la superficie de los linfocitos B. Esta interacción CD40-CD40L induce varios procesos claves de la respuesta T-dependiente: mayor proliferación, diferenciación temprana de los linfocitos B hacia células productoras de anticuerpos en los focos extrafoliculares (llamados así porque se forman fuera de la zona B folicular), cambio de clase de inmunoglobulina (Ig), e inducción de la formación de centros germinales. En los focos extrafoliculares, los linfocitos B activados tienen tres destinos: algunos se diferencian en células plasmáticas de vida corta que producen una respuesta rápida mediada por anticuerpos de baja afinidad, principalmente del tipo IgM. Otros se diferencian a células de memoria, principalmente del tipo IgM con poca maduración de afinidad por el antígeno, mientras que otros linfocitos B activados en el foco extrafolicular migran de vuelta al folículo y forman centros germinales. Los centros germinales son estructuras especializadas donde los linfocitos B proliferan extensivamente y, mediante hipermutación somática, aumentan la afinidad de sus anticuerpos –proceso denominado maduración de la afinidad–.

Por otra parte, el estímulo CD40-CD40L de los linfocitos T cooperadores junto con citoquinas producidas en el centro germinal, promueven el cambio de clase de inmunoglobulinas donde el linfocito B cambia la región constante de la Ig (o isotipo) de IgM e IgD, a otros como IgG, IgE o IgA. Cada isotipo de inmunoglobulina ejecuta funciones efectoras distintas. El cambio de clase de Ig hacia un determinado isotipo está regulado por el patrón de citoquinas secretadas por los linfocitos T cooperadores que se inducen en función de la naturaleza del patógeno y del sitio anatómico donde se inició la respuesta (McHeyzer-Williams & McHeyzer-Williams, 2005; Kurosaki et al. 2015).

En el centro germinal se seleccionan y sobreviven aquellos linfocitos B con alta afinidad de su BCR por el antígeno. Una fracción de los linfocitos B seleccionados se diferencian a células plasmáticas de larga vida que secretan anticuerpos de alta afinidad continuamente durante largos periodos y sobreviven en nichos especializados dentro de la médula ósea (Yoshida et al. 2010). Otros linfocitos B se diferencian en células de memoria que retienen la Ig específica en su superficie, generalmente del tipo IgG. Ante un reencuentro con el antígeno, la activación de los linfocitos B de memoria produce una respuesta secundaria caracterizada por ser más rápida, más específica, de mayor magnitud y con mayor proporción de cambio de isotipo (M. G. McHeyzer-Williams & Ahmed, 1999). Ambos estadios finales de diferenciación de los linfocitos B le otorgan al organismo una protección de larga duración contra patógenos a los que ha sido

expuesto (McHeyzer-Williams & Ahmed, 1999; Yoshida et al., 2010, Kurosaki et al. 2015; Akkaya et al. 2020).

### **1.3 Fenotipo y localización de los linfocitos B de memoria**

Los linfocitos B de memoria son un componente esencial de la memoria frente a infecciones e inmunidad adquirida mediante la vacunación. Consecuentemente, ha existido un gran esfuerzo por dilucidar interrogantes básicas sobre estas células que incluyen dónde y cómo logran sobrevivir durante largos periodos de tiempo, y cómo pueden ser identificadas y estudiadas con mayor profundidad en modelos preclínicos y en estudios con humanos. En este sentido, la experimentación con modelos murinos ha permitido dar avances significativos que no hubiesen sido posibles en estudios con humanos. En el estudio de la diferenciación y características funcionales de los linfocitos B de memoria, la principal estrategia ha consistido en el uso de ratones transgénicos que poseen linfocitos B de especificidad conocida. Estos modelos permiten inmunizar contra dicho antígeno para posteriormente rastrear la respuesta de los linfocitos B específicos y analizar diversas propiedades de las células de memoria generadas en los órganos linfoides secundarios (Dhenni & Phan 2020). Estos estudios han permitido dar cuenta de que en respuesta a un antígeno se produce un conjunto heterogéneo de linfocitos B de memoria que se distinguen por la expresión del isotipo de Ig, la expresión de marcadores de superficie y su función efectora al ser reactivados (Cancro & Tomayko, 2021).

Hasta la fecha, no existe un marcador definitivo que permita distinguir a los linfocitos B de memoria. En ratón, típicamente han sido identificados como linfocitos B IgD<sup>-</sup> que han realizado cambio de isotipo y que carecen la expresión de marcadores de centro germinal (GL-7, Fas y/o PNA). Posteriormente, también se describió la formación de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>, que se expanden y diferencian rápidamente en respuesta a su antígeno, recapitulando características funcionales asociados a memoria (Cancro & Tomayko 2021; Yoshida et al., 2010). Estos linfocitos B de memoria que retienen la expresión de IgM<sup>+</sup> difieren en sus funciones en la respuesta inmune secundaria en comparación con los que realizan cambio de isotipo a IgG. Los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> tienden a ser más proliferativos y generar nuevos centros germinales al reactivarse con el antígeno, mientras que los linfocitos B con cambio de isotipo a IgG tienen una mayor predisposición a diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad (Yoshida et al. 2010; Cancro and Tomayko 2021; Kurosaki et al. 2015; Pape et al. 2011; Dogan et al. 2009). También se han propuesto nuevos marcadores complementarios a la expresión de IgD e IgM para identificar a los linfocitos B de memoria, cuya expresión aumenta en linfocitos B específicos que son activados con su respectivo antígeno (Cancro & Tomayko 2021; Yoshida et al., 2010). Al inmunizar ratones con un antígeno definido, los linfocitos B de memoria en órganos linfoides secundarios tienen una mayor expresión de CD73, el ligando de muerte programada 2 (PD-L2), y CD80 (Tomayko et al. 2010; He et al. 2017; Koike et al. 2019; Allie et al. 2019; Cancro & Tomayko 2021; Zuccarino-Catania et al. 2014;

Onodera et al. 2012). Estructuralmente, CD73 es una enzima ectonucleotidasa que cataliza la conversión de AMP a adenosina y de esta forma modular la inflamación, mientras que las moléculas PD-L2 y CD80 pertenecen a la familia de las moléculas regulatorias inmunes B7. Es importante notar que la expresión de estos marcadores es heterogénea en los linfocitos B de memoria, pudiendo distinguirse tanto subpoblaciones que expresan estas moléculas por separado como otras que las co-expresan. La jerarquía en la expresión de estos marcadores denota el estado terminal de diferenciación y potencial de las funciones efectoras ante una segunda activación. Las células de memoria IgM<sup>+</sup>, que tienen poca maduración de afinidad, por lo general, carecen de estos marcadores y al reactivarse, preferentemente forman centros germinales donde realizan cambio de clase y maduración de la afinidad (Dogan et al. 2009). En tanto, aquellas IgM<sup>+</sup> que expresan CD73 y/o PD-L2 se diferencian rápidamente hacia células secretoras de anticuerpos. En el caso de los linfocitos B de memoria IgG<sup>+</sup>, aquellos que expresan solo CD73 o PD-L2 mantienen su potencial de formar nuevos centros germinales y diferenciarse a células plasmáticas, mientras que aquellas que co-expresan CD73, PD-L2 y CD80 tienden a dar origen exclusivamente a células plasmáticas (Zuccarino-Catania et al. 2014; Tomayko et al. 2010; Cancro & Tomayko 2021). Esta heterogeneidad otorga una amplitud funcional a la respuesta humoral secundaria, dando lugar a una rápida producción de anticuerpos y a la vez, manteniendo el potencial de formar nuevas células de memoria y células plasmáticas de distinta especificidad.

Un aspecto no trivial es la distribución anatómica de los linfocitos B de memoria. Es necesario que estas células circulen y se localicen en lugares estratégicos que favorezcan la probabilidad de re-encuentro con antígenos externos. Además de encontrarse en la circulación, se ha identificado que la zona marginal del bazo y el seno subcapsular de los órganos linfoides secundarios son reservorios importantes de células de memoria (Palm & Henry, 2019; Takemori et al., 2014; Moran et al., 2018) , siendo estos sitios donde se retienen antígenos capturados por el sistema linfático. Además, se han podido encontrar en otros tejidos linfoides como la médula ósea, placas de Peyer, y en tejido inmune asociado a mucosas como las encías y la lámina propia intestinal (Lindner et al., 2015; Palm & Henry, 2019; Tangye & Tarlinton, 2009; Vajdy & Lycke, 1993). En los últimos años, diversos trabajos indican que los linfocitos B de memoria también son reclutados al tejido donde ocurrió la infección y se mantienen como células residentes, que no recirculan. Estos linfocitos B de memoria residentes se activan localmente ante un reencuentro con el antígeno y ejercen funciones efectoras que entregan una rápida protección del tejido. Hasta ahora el establecimiento de linfocitos B de memoria residentes ha sido descritos principalmente en infecciones respiratorias, donde estas células colonizan el pulmón y vías respiratorias (Barker et al. 2021; MacLean et al. 2022; Allie et al. 2019; Oh et al. 2021; Tan et al. 2022).



#### **1.4 El timo contiene una población inusual de linfocitos B residentes**

El timo es un órgano linfoide primario ubicado en la cavidad torácica superior donde ocurre la maduración de los linfocitos T a partir de progenitores derivados de la médula ósea (Zúñiga-Pflücker, 2004). Este órgano está organizado en dos compartimentos donde ocurren distintas etapas de la maduración de los linfocitos T: la corteza exterior y la médula interior. Cada compartimento posee un ambiente propicio para la maduración y selección de los linfocitos T conformado por diferentes tipos de células presentadoras de antígenos (Klein et al., 2014). En la corteza, las células epiteliales corticales tímicas (cTEC) participan en la etapa de maduración llamada selección positiva, en la que sobreviven aquellos linfocitos T inmaduros CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> que expresan un TCR funcional capaz de unirse a moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) o clase II (MHC-II), para diferenciarse en linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos o CD4<sup>+</sup> cooperadores, respectivamente. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> inmaduros que sobreviven la selección positiva migran a la médula tímica, donde interactúan con distintos tipos de células presentadoras de antígenos, siendo las más conocidas las células epiteliales medulares tímicas (mTEC) y las células dendríticas. En esta etapa de maduración –llamada selección negativa– se presentan antígenos propios a los linfocitos T inmaduros, y aquellos que poseen una alta afinidad son eliminados mediante la inducción de apoptosis o pueden ser programados a linfocitos T reguladores que restringen la activación de linfocitos T autorreactivos en los tejidos (Szondy et al. 2012; Klein et al. 2014; Lu et al. 2015). Además de la

presentación de autoantígenos para la eliminación de linfocitos T autoreactivos, durante la etapa de selección negativa también existe evidencia que sugiere que además se presentan moléculas y metabolitos provenientes de la microbiota para “educar” a los linfocitos T para que no se genere una respuesta inmune en contra de las bacterias comensales que colonizan de manera fisiológica distintos sitios anatómicos como lo son el intestino o la piel (Cebula et al. 2013; Nanjundappa et al. 2022; Zegarra-Ruiz et al. 2021).

Además de las células anteriormente mencionadas, el timo posee una población de linfocitos B. Tanto en humano como ratón, los linfocitos B residen en la médula y corresponden a alrededor de un 0.2 – 1% del total de las células del timo, no obstante, su frecuencia aumenta con la edad (Akashi et al. 2000; Ceredig 2002; Miyama-Inaba et al. 1988; Punnonen & de Vries 1993; Isaacson et al. 1987; Spencer et al. 1992; Nuñez et al. 2016; Cepeda et al. 2018). El posicionamiento de los linfocitos B en la médula tímica y su capacidad intrínseca para presentar antígenos motivó numerosos estudios que en conjunto muestran que esta población tiene un rol en la selección negativa presentando autoantígenos a los linfocitos T inmaduros (Ferrero et al. 1999; Frommer and Waisman 2010; Fujihara et al. 2014; Inaba et al. 1991; Perera et al. 2013; Yamano et al. 2015; Perera et al. 2016; Mazda et al. 1991; Kleindienst et al. 2000; Frommer et al. 2008; Rudensky et al. 1990).

Consistente con lo anterior, los linfocitos B de timo poseen varias características que apoyan su función como células presentadoras de antígenos especializadas en este órgano. Tanto en humano como ratón, continuamente presentan un fenotipo activado que consiste en una alta expresión de MHC-II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, en comparación con los linfocitos B de la circulación y órganos linfoides secundarios como el bazo (Yamano et al., 2015; Perera et al., 2013; Ferrero et al., 1999; Lu et al., 2015, Nuñez et al. 2016). Además, hallazgos recientes muestran que una fracción significativa de los linfocitos B tímicos expresan el factor de transcripción *Aire* (AutoInmune REgulator), cuya expresión se había reportado exclusivamente en células epiteliales tímicas medulares. *Aire* promueve una expresión promiscua de numerosos antígenos tejidos-específicos permitiendo establecer tolerancia a una gran variedad de autoantígenos (Yamano et al., 2015; Gardner et al., 2009). Notablemente, evidencia obtenida por el grupo de Yamano, ilustra sobre un proceso de “licenciamiento” tímico, mediante el cual los linfocitos B son programados en el timo para adquirir este fenotipo especializado que promueve su capacidad como célula presentadora de antígeno. Ellos muestran al transferir intravenosamente linfocitos B *naive*, que aquellos que entran al timo adquieren las características fenotípicas de los linfocitos B residentes del timo, es decir, aumentan la expresión de las moléculas MHC-II, CD80 y CD86, y adquieren la expresión de *Aire* (Yamano et al., 2015).

Por otra parte, una observación relevante que ha sido reportada en relación con el fenotipo de los linfocitos B tímicos es que una proporción significativa (15-30%) realiza cambio de isotipo (no expresan IgD e IgM), mientras que normalmente los linfocitos B de la periferia están compuestos principalmente por linfocitos B *naive* IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>. Aquello es inusitado, dado que esto se observa en ratones sin previa infección o inmunización, sumado al hecho que el timo es un órgano linfoide primario que no recibe antígenos mediante el sistema linfático y no orchestra respuestas adaptativas (Yamano et al. 2015; Perera et al. 2013; Perera et al. 2016). Dentro de los linfocitos B tímicos con cambio de clase, se ha determinado que estos incluyen linfocitos B que expresan isotipos de las inmunoglobulinas IgG e IgA, siendo la más frecuente la IgG2b (Perera et al., 2016; Yamano et al., 2015). Hay evidencia que sugiere que el cambio de isotipo en el timo sería estimulado durante la presentación de autoantígenos e interacción con los linfocitos T inmaduros. Por otro lado, en ratones deficientes de linfocitos T o cuyos linfocitos B carecen de MHC-II se ve drásticamente reducida la población de linfocitos B tímicos IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> con cambio de clase. Además, se ha demostrado que la interacción CD40/CD40L entre los linfocitos T-B es necesaria tanto para que los linfocitos B residentes del timo presenten el fenotipo característico de presentación antigénica como para que ocurra el cambio de isotipo de los linfocitos B en el timo (Akirav et al., 2011; Fujihara et al., 2014; Perera et al., 2016; Yamano et al., 2015).

En resumen, los linfocitos B convencionalmente sufren cambio de clase de Ig y se diferencian en células de memoria en los órganos linfoides secundarios durante una respuesta inmune frente a algún antígeno externo. Sin embargo, existe creciente evidencia que indica que los linfocitos B presentes en el timo realizan cambio de isotipo de inmunoglobulina como resultado de su función local en la selección tímica, independiente de estímulos como infección o inmunización. Por lo tanto, resulta importante dilucidar si en el timo ocurre un proceso de diferenciación de linfocitos B de memoria no convencional, y que implicancia podría tener en el papel de la tolerancia central. En este trabajo nos propusimos determinar si los linfocitos B tímicos que realizan cambio de isotipo recapitulan el fenotipo de los linfocitos B de memoria periféricos, y evaluamos si la diferenciación hacia células de memoria ocurre de forma independiente a la exposición de antígenos externos y por consecuente, la formación de linfocitos B de memoria en órganos linfoides periféricos, en respuesta a la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en desarrollo.

## 2. HIPÓTESIS

Clásicamente, los linfocitos B de memoria se generan en los órganos linfoides secundarios en respuesta a antígenos externos. Sin embargo, diversos trabajos en la literatura han descrito que los linfocitos B presentes en el timo de ratones sin infección ni inmunizaciones previas presentan un fenotipo de memoria, exhibiendo un aumento de la expresión de marcadores de activación y también cambio de isotipo de inmunoglobulina. Además, han propuesto que la interacción entre los linfocitos B-T promueve el cambio de isotipo y el fenotipo activado que presentan los linfocitos B tímicos. Basado en estos antecedentes, en este trabajo se propuso que:

**“Los linfocitos B presentes en el timo expresan características fenotípicas de memoria de manera independiente a la activación por antígenos externos, promovido por la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en desarrollo”**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el fenotipo de memoria en los linfocitos B tímicos, y estudiar si la exposición a antígenos externos y la interacción con los timocitos influye en la formación de linfocitos B de memoria en el timo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Analizar la expresión de marcadores de superficie asociados a células de memoria periféricas en los linfocitos B presentes en el timo.
2. Evaluar la frecuencia de linfocitos B de memoria tímicos en ratones tratados con antibióticos perinatalmente bajo condiciones de esterilidad.
3. Evaluar la adquisición del fenotipo de memoria en linfocitos B del timo asociada con la edad.
4. Evaluar la influencia de la interacción entre los linfocitos B y los timocitos en la diferenciación de los linfocitos B tímicos hacia células de memoria.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Ratones

Ratones de la cepa C57BL/6 (B6) y BALBcJ de aproximadamente 6 semanas de edad se obtuvieron para los experimentos de la caracterización del fenotipo de los linfocitos B de órganos linfoides periféricos y del timo. Para los experimentos de parabiosis, se unieron quirúrgicamente ratones C57BL/6 (CD45.2) y B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pepc<sup>b</sup>*/BoyJ (B6.SJL CD45.1) congénicos. Para el tratamiento con antibióticos perinatal se utilizaron ratones C57BL/6 de aproximadamente 6 semanas de edad los cuales se separaron en los grupos control y tratado. Por último, para evaluar la frecuencia de los linfocitos B del timo asociada a la edad se utilizaron ratones C57BL/6, los cuales fueron separados según los siguientes grupos etarios: neonatal (0 – 7 días), jóvenes (2 – 12 semanas), adultos (3 – 9 meses), mediana edad (10 – 14 meses) y viejos (>18 meses). Los ratones fueron obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos (SPF) en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida (Santiago, Chile). Los animales fueron sacrificados mediante la exposición a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Este trabajo se encuentra en acuerdo con las normas institucionales del Centro Científico y Tecnológico de Excelencia Ciencia & Vida.



#### 4.1.2 Anticuerpos para citometría de flujo

Para la caracterización de los linfocitos B y sus subpoblaciones se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos: GL7-FITC (clon GL7, BioLegend), PD-L2-PE (clon TY25, BioLegend), CD73-APC (clon TY/11.8, BioLegend), CD21/35-BV421 (clon 7Ea, BioLegend), B220-BV510 (clon RA3-6B2, BioLegend), IgD-BV650 (clon 11-2bc.2a, BioLegend), CD19-BV711 (clon 6D5, BioLegend), IgG2b-FITC (clon RMG2b-1, BioLegend), IgA-PE (clon mA-6E1, Invitrogen), IgM-PE Cy7 (clon RMM-1, BioLegend), CD45.1-PE Cy7 (clon A20, BioLegend), CD45.2-APC (clon 104, BioLegend) y GL-7-APC (clon GL-7, BioLegend). Además, se utilizó el anticuerpo monoclonal CD16/CD32 (Fc Block) (clon 93, BioLegend).

#### 4.1.3 Antibióticos

Para el tratamiento con antibióticos perinatales se usó: Ampicilina (US Biological) (1mg/mL), Vancomicina (PhytoTech Lab) (0,5 mg/mL), Neomicina (PhytoTech Lab) (1mg/mL), y Metronidazol (Cayman Chemical) (1mg/mL).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Aislamiento de células de bazo, timo, ganglio mesentérico, y placas de Peyer

Para la obtención de células del bazo, se extrajo el bazo del ratón y se perfundió con 10mL de RPMI + 10% SFB para obtener una suspensión celular. Esta suspensión se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 2mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (*RBC Lysis Buffer*, BioLegend) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Las células se lavaron con 10 mL de RPMI + 10% SFB y se resuspendieron en el mismo medio.

Para la obtención de las células del timo y del órgano linfóide mesentérico (MLN por *Mesenteric Lymph Node*), estos se extrajeron y colectaron en 0,5 mL de RPMI + 10% SFB. Se disgregaron mecánicamente con un homogenizador de tejidos manual. La suspensión celular se filtró por una malla metálica de 90µm lavando la malla con RPMI + 10% SFB hasta completar un volumen total de 5 mL. Luego se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet de células se resuspendió en el mismo medio.

Para la obtención de las células de las Placas de Peyer (PP por *Peyer's patches*), se extrajo el intestino delgado y se recibió en una placa Petri con PBS frío. Se disectaron 6-8 PP a lo largo del intestino delgado y se disgregaron mecánicamente con un homogenizador de tejido manual. La suspensión celular

se filtró por una malla metálica de 90µm lavando la malla con RPMI + 10% SFB hasta completar un volumen total de 5 mL. Luego se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet de células se resuspendió en el mismo medio.

Para determinar el número de células obtenido, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se contaron las células en una cámara de Neubauer, utilizando tinción de azul tripán para evaluar la viabilidad celular.

#### 4.2.2 Análisis de moléculas de superficie por citometría de flujo

La caracterización fenotípica de distintas poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo multiparamétrica. Para analizar un número representativo de subpoblaciones de linfocitos B de cada tipo de órgano se usaron los siguientes números de células por tinción:  $2,5 \times 10^6$  de células de bazo,  $2,5 \times 10^6$  de células de MLN,  $2,5 \times 10^6$  de células de PP, y  $5 \times 10^6$  de células de timo. Las células se lavaron en buffer FACS (PBS + 2% SFB) y se incubaron con un anticuerpo contra CD16/32 (Fc Block) en buffer FACS durante 15 minutos a 4°C en oscuridad para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos por receptores Fc. Posteriormente, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes para la detección de moléculas de superficie en buffer FACS durante 25 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 900mL de buffer FACS, se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos, y se resuspendieron en 300uL de buffer FACS. Para descartar las células muertas se añadió a cada muestra yoduro de

propidio (PI) a una concentración de 1,6µg/mL. Las células fueron analizadas en un citómetro FACSAria III (BD Biosciences) y los datos de citometría se analizaron con el programa FlowJo v10.4 (Tree Star, Inc).

#### 4.2.3 Cirugía de parabiosis

La cirugía de parabiosis se realizó en ratones hembras C57BL/6 CD45.1 y CD45.2. Cada pareja se puso a convivir en misma caja durante dos semanas antes de la operación para disminuir la probabilidad de agresión entre ellas. Para la cirugía, los ratones fueron anestesiados con avertin (2,2,2-Tribromoetanol, Sigma Aldrich) (250mg/kg) administrado vía intraperitoneal. Los ratones fueron rasurados a lo largo de los flancos opuestos para realizar una incisión longitudinal en la piel desde el codo hasta la rodilla. La piel se separó del tejido conectivo para dejar aproximadamente 1cm de piel libre. Se unieron los ratones con suturas no absorbibles en las articulaciones del codo y rodilla, y la piel se unió usando clips quirúrgicos y suturas con doble nudo en las zonas del codo y rodilla. Durante y posterior al procedimiento, la temperatura corporal de los animales se mantuvo controlada mediante una almohadilla. Los ratones recibieron Tramadol (50mg/kg) vía subcutánea como método analgésico antes de iniciar la cirugía.

#### 4.2.4 Tratamiento con antibióticos perinatal

Para establecer un modelo con una reducida colonización de la microbiota comensal, se realizó un tratamiento perinatal con un cóctel de los siguientes

antibióticos: Ampicilina (1mg/mL), Vancomicina (0,5 mg/mL), Neomicina (1mg/mL), y Metronidazol (1 mg/mL) disueltos en agua potable autoclavada, según ha sido reportado anteriormente en la literatura (Li et al. 2017; Lamoué-Smith et al. 2011; Deshmukh et al. 2014; Gonzalez-Perez et al. 2016). El cóctel de antibióticos se comenzó a dar a ratonas preñadas cinco días antes de la fecha probable de parto y se continuó con su administración durante el periodo de lactancia y destete. Las crías se mantuvieron con el cóctel de antibióticos durante seis semanas, momento en que fueron sacrificadas para el análisis. Un grupo control recibió agua autoclavada durante todo el experimento. Ambos grupos de experimentación se mantuvieron en jaulas con un sistema de ventilación con filtro Hepa, y agua y alimento autoclavados para minimizar la exposición a antígenos ambientales.

#### 4.2.5 Cuantificación de bacterias mediante citometría de flujo

El efecto de los antibióticos en el número de bacterias intestinales se midió por citometría de flujo. Las bacterias presentes en muestras fecales frescas, fueron cuantificadas con el reactivo *Syto™ BC green fluorescent nucleic acid stain* (Invitrogen). Heces frescas fueron colectadas en PBS estéril y pesadas. Las heces se disgregaron con vórtex durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 800 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se traspasó a tubos estériles para proceder a realizar diluciones seriadas en PBS. A 1mL de cada muestra se les agregó 1uL de SytoBC y se incubaron durante 15

minutos a 37°C. Luego, se les agregaron 25uL de las beads para recuento celular por citometría (*Precision Count Beads*, Biolegend) que se encontraban a una concentración de  $1,01 \times 10^6$  bead/mL. Las muestras se adquirieron en un analizador FACSCanto II (BD, Bioscience). Las bacterias muertas fueron excluidas del análisis utilizando yoduro de propidio (Sigma Aldrich) a una concentración de 3µg/mL.

#### 4.2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, todos los datos se sometieron a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Para el análisis entre dos grupos se utilizó una prueba-t de Student de dos colas no pareado (prueba paramétrica) o la prueba Mann-Whitney (no paramétrico) según el resultado de la prueba de normalidad. Para comparaciones entre más de dos grupos, las diferencias estadísticas se calcularon con un ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple de Tukey (pruebas paramétricas). Cuando uno o más de los grupos no siguieron una distribución normal se realizó una prueba ANOVA Kruskal-Wallis seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Los resultados se muestran con todos los puntos de experimentación.

Para el análisis estadístico del cambio de frecuencia y número de poblaciones de linfocitos B asociados a la edad, se elaboraron gráficos de correlación, donde se muestra el coeficiente de determinación  $R^2$  y el valor de probabilidad (p). Si los

datos eran normales se realizó una correlación de Pearson, mientras que si los datos no seguían una distribución normal, se realizó una correlación de Spearman. En los gráficos de correlación, cada punto representa un ratón.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con intervalos de confianza de un 95%. Los valores exactos de probabilidad  $p < 0.05$  significativos se muestran en cada figura. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 8.1.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los detalles de la estadística usada se pueden encontrar en las leyendas de las figuras.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 El timo contiene una proporción significativa de linfocitos B que han realizado cambio de isotipo de inmunoglobulina

Estudios recientes muestran que los linfocitos B del timo exhiben un fenotipo activado, y que una proporción ha realizado cambio de isotipo de inmunoglobulina lo cual sugiere que se han activado y diferenciado a linfocitos B de memoria. Sin embargo, no se ha esclarecido si esta población recapitula otras características fenotípicas asociadas a linfocitos B de memoria convencionales que se encuentran en los órganos linfoides secundarios. Nuestro primer objetivo fue analizar la expresión de marcadores asociados a células de memoria en los linfocitos B de timo de ratones C57BL/6. Para ello, también se analizó el fenotipo de los linfocitos B en el bazo como control de lo observado en un órgano linfoide secundario, y en las placas de Peyer (PP), dado que son estructuras linfoides asociadas al intestino donde ocurre una activación basal de los linfocitos B en respuesta a antígenos de la dieta y de la microbiota intestinal (Reboldi & Cyster 2016; Reboldi et al. 2016). En primera instancia, analizamos la expresión de las inmunoglobulinas IgD e IgM, que permiten identificar a los linfocitos B *naive* (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> sin cambio de clase y los linfocitos B de zona marginal (ambos IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>), y los linfocitos B de memoria que han realizado cambio de clase (IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>). Corroboramos que, en condiciones homeostáticas, los linfocitos B del bazo poseen una proporción baja de linfocitos B con cambio de clase, mientras que esta población es mayor en las PP. Importantemente, los

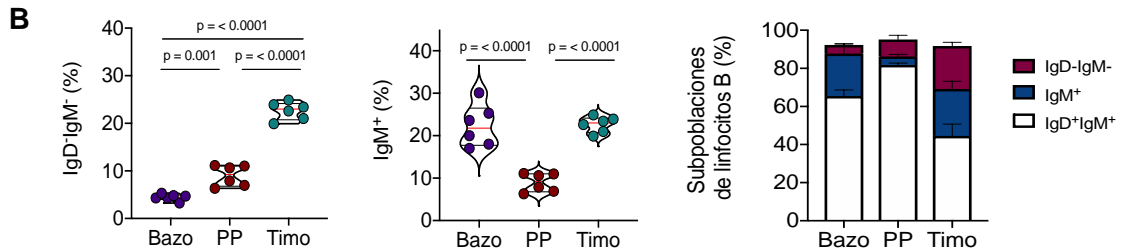
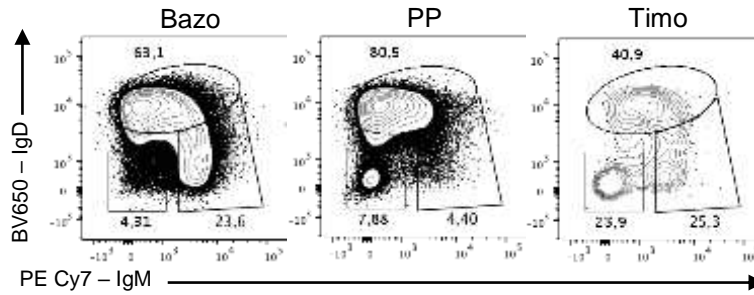


linfocitos B tímicos presentan una frecuencia de linfocitos B IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> significativamente mayor en comparación con el bazo y las PP (**Fig. 1 A-B**). Además, observamos que tanto en bazo y timo, cerca de un 25% de los linfocitos B son IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>, mientras que en las PP representan una población minoritaria. Dado que el bazo se caracteriza por contener una población abundante de linfocitos B de zona marginal, también evaluamos los marcadores CD21/CD23 para discriminar entre linfocitos B foliculares (CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>), que recirculan e inician una respuesta de memoria frente al antígeno, y los linfocitos B de zona marginal (IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>), los cuales participan en respuestas rápidas mediadas por IgM y no generan memoria (Allman & Pillai 2008; Martin & Kearney 2002). Observamos que los linfocitos B IgM<sup>+</sup> en el bazo corresponden tanto a células de la zona marginal (CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) como linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup>CD21/35<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> (**Fig. S1**). En contraste, ninguna de las subpoblaciones de linfocitos B tímicos analizadas contienen células con fenotipo de linfocitos B de zona marginal (**Fig. S2**).

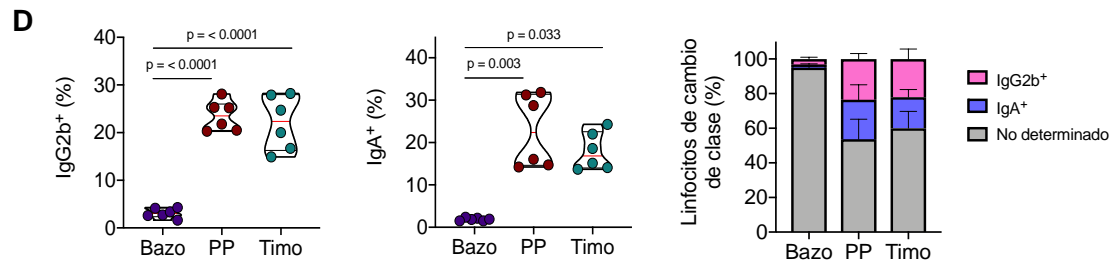
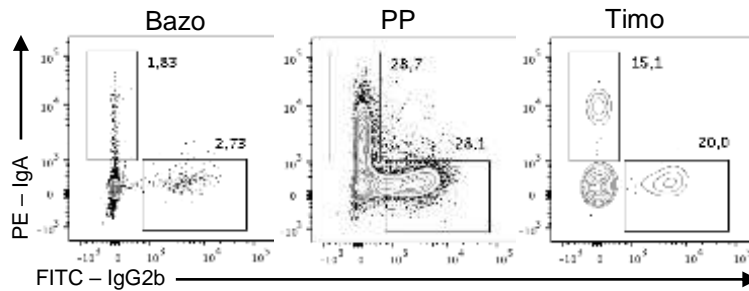
El cambio de clase de inmunoglobulina permite que los linfocitos B de memoria y células plasmáticas expresen y secreten inmunoglobulinas de distintos isotipos efectores como IgG, IgA e IgE. A continuación, nos propusimos evaluar cuáles isotipos son expresados por los linfocitos B que han realizado cambio de clase en el timo. Mediante citometría, analizamos la expresión de dos isotipos predominantes a nivel sistémico y en las mucosas: IgG2b e IgA. Observamos que el timo contiene linfocitos B que expresan IgG2b<sup>+</sup> (~20%) e IgA<sup>+</sup> (~20%), similar

a lo observado en los linfocitos B de las PP. En cambio, los linfocitos B IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> de bazo contienen porcentajes significativamente menores de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>, sugiriendo que este órgano contiene linfocitos B de memoria que expresan otros isotipos que no fueron determinados en este trabajo (**Fig. 1 C-D**). Estos resultados muestran que, en ratones sin previa inmunización, el timo contiene linfocitos B en el timo que han realizado cambio de clase, dentro de los cuales una proporción importante expresa IgG2b e IgA.

**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>



**C** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>

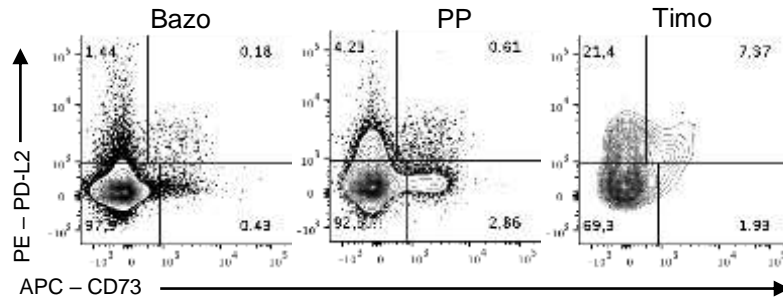


**Figura 1. Los linfocitos B tímicos presentan un fenotipo de cambio de clase, y expresan las inmunoglobulinas a IgG2b e IgA. (A-B)** Gráficos de citometría de flujo representativos y de frecuencia de linfocitos B *naïve* (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), IgM<sup>+</sup> (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>), y cambio de clase (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>) en bazo, PP y timo. **(C-D)** Gráficos de citometría de flujo y frecuencia de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en bazo (n=6), PP (n=6), y timo (n=6). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba ANOVA de una vía o con una prueba Kruskal-Wallis dependiendo del resultado de la prueba de normalidad seguido por una prueba de comparación múltiple según corresponda. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. PP, placas de Peyer; %, frecuencia.

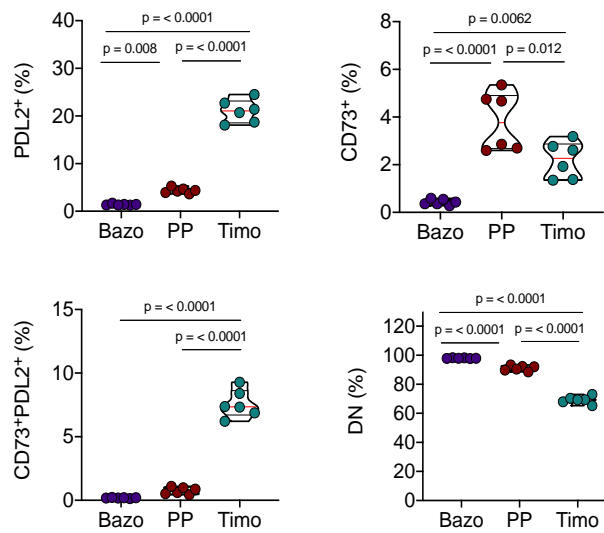
## 5.2 Los linfocitos B del timo expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2

Un área que ha tenido considerable atención en los últimos años es la identificación de nuevos marcadores fenotípicos para definir y caracterizar linfocitos B de memoria generados en respuesta a infección o inmunización. Una gran proporción expresa las moléculas CD73 y PD-L2 por separado, o co-expresan ambas moléculas (Allie et al. 2019; Tomayko et al. 2010; Cancro & Tomayko 2021). Con el objetivo de determinar si los linfocitos B del timo se asemejan a los linfocitos B convencionales, analizamos mediante citometría de flujo la expresión estas dos moléculas. En acuerdo con los resultados de la expresión de inmunoglobulinas en ratones sin previa inmunización, los linfocitos B de bazo en su mayoría carecen de la expresión de marcadores de memoria. En comparación, en las PP se observa una proporción significativamente mayor de células CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, lo cual es consistente con una activación continua y formación de células de memoria en este sitio. Interesantemente, en el timo encontramos una proporción significativamente mayor de linfocitos B de memoria CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> en comparación con el bazo y las PP (**Fig. 2**). En resumen, en condiciones homeostáticas el timo contiene una subpoblación de linfocitos B que ha realizado cambio de clase y expresa marcadores fenotípicos de células de memoria.

**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>



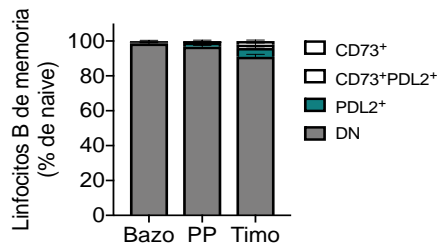
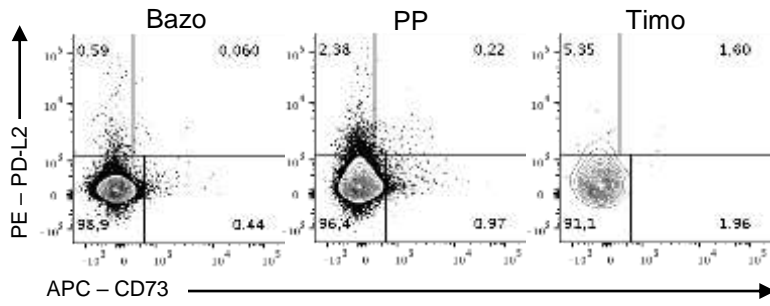
**B**



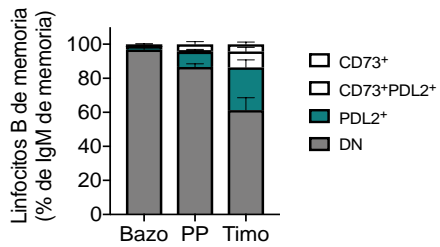
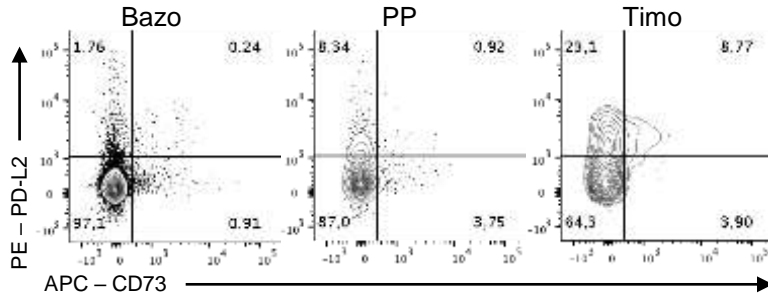
**Figura 2. Subpoblaciones de linfocitos B tímicos expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2. (A-B)** Gráficos de citometría de flujo representativos. **(B)** Frecuencia de los linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> en bazo (n=6), placas de Peyer (n=6) y timo (n=6) de ratones C57BL/6 con una mes y medio de edad. Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. PP, placas de Peyer; %, frecuencia.

Al validar que los marcadores CD73 y PD-L2 efectivamente permiten distinguir células *naive* versus memoria, hicimos un análisis más fino para evaluar la expresión de CD73 y PD-L2 en cada subpoblación de linfocitos B: *naive*, IgM<sup>+</sup> de memoria, e IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> de cambio de clase en bazo, PP y timo. Encontramos que cerca de un >90% de los linfocitos B *naive* en todos los órganos analizados no expresan ninguno de los marcadores de memoria (**Fig. 3A**). En cambio, en los linfocitos B IgM<sup>+</sup> de memoria y, en particular, los de cambio de clase en el timo y PP se ve significativamente más enriquecida la expresión de CD73 y PD-L2 (**Fig. 3C-D**). Estos resultados apoyan que la expresión de ambos marcadores está relacionada con la adquisición de un fenotipo de memoria en los linfocitos B, tanto en órganos linfoides secundarios como en el timo.

**A** Gate en linfocitos B *naïve* (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>)

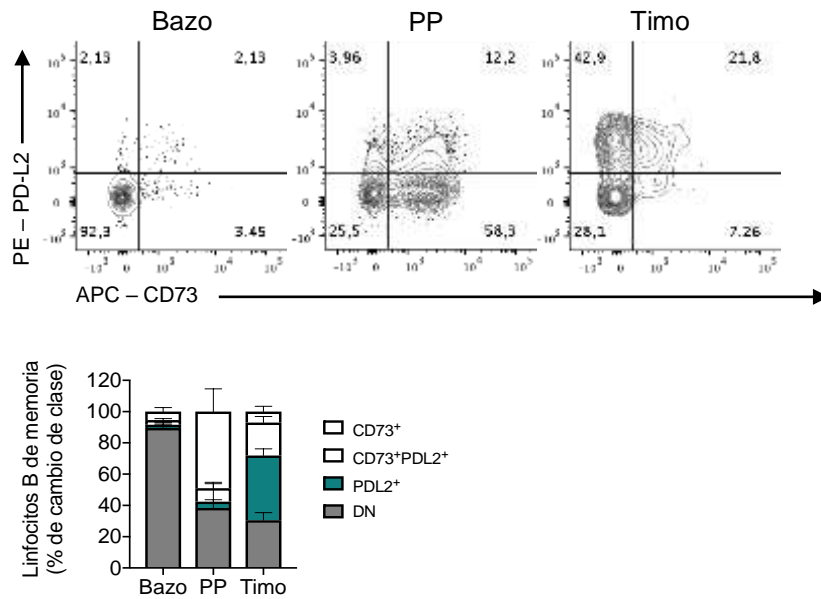


**B** Gate en linfocitos B IgM (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>)



La figura y leyenda continua en la próxima página

**C** Gate en linfocitos B de cambio de clase (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>)



**Figura 3. Los linfocitos B IgM<sup>+</sup> y de cambio de clase expresan en mayor proporción los marcadores de memoria CD73 y PD-L2.** Gráficos de citometría de flujo representativos y de frecuencia de expresión de los marcadores de memoria CD73 y PD-L2 en las subpoblaciones: **(A)** *naive* (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), **(B)** IgM<sup>+</sup> (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>), y **(C)** cambio de clase (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>). PP, placas de Peyer; %, frecuencia.

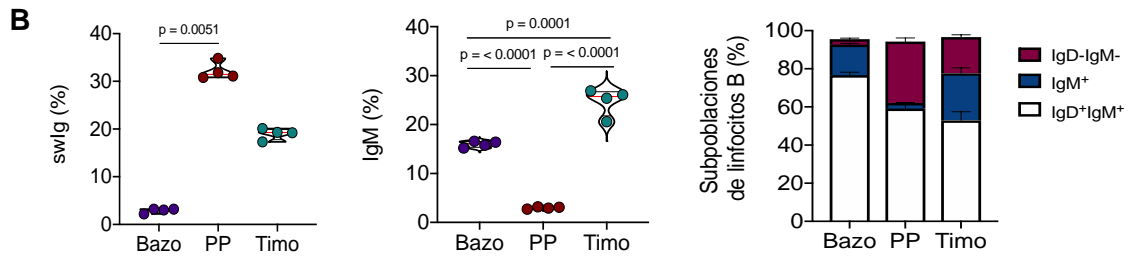
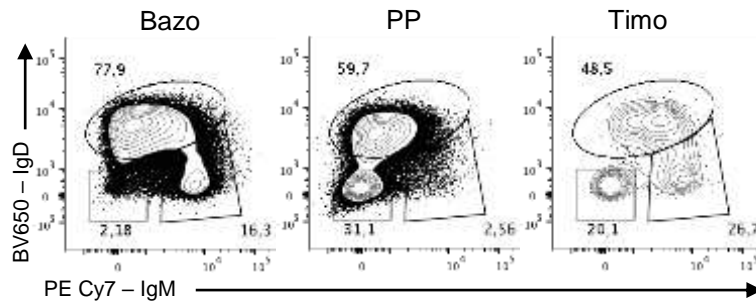


En el proceso de diferenciación a células de memoria, los linfocitos B *naive* que se activan en los órganos linfoides secundarios forman estructuras llamadas centros germinales, los cuales son compartimientos transitorios donde los linfocitos B proliferan, maduran su afinidad por el antígeno y adquieren un compromiso transcripcional hacia células de memoria o células plasmáticas (Takemori et al. 2014). A continuación, con el objetivo de determinar si la activación y diferenciación de los linfocitos B en el timo ocurriría de forma local, evaluamos la presencia de linfocitos B con un fenotipo IgD<sup>-</sup>GL-7<sup>+</sup> que permite identificar a los linfocitos B de centro germinal. Encontramos que, en ratones sin previa inmunización, es posible detectar linfocitos B con un fenotipo de centro germinal IgD<sup>-</sup>GL-7<sup>+</sup> en bazo, PP y timo. De manera esperable, el bazo contiene la menor proporción de células GL-7<sup>+</sup> (~0.5%), mientras que tanto en las PP y el timo esta población es al menos 10 veces mayor (~4% y ~6%, respectivamente) (**Fig. 4**). Esta observación es consistente con nuestros resultados anteriores que señalan una mayor formación basal de linfocitos B de memoria en timo y PP. Es importante destacar que en la estrategia de los análisis de las poblaciones de linfocitos B de memoria se excluyeron los linfocitos B de centro germinal IgD<sup>-</sup>GL-7<sup>+</sup> por ser un estadio de diferenciación anterior a la formación de linfocitos B de memoria.

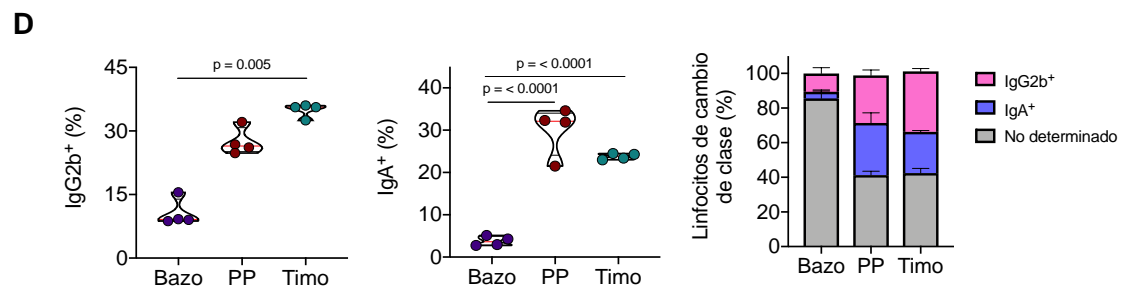
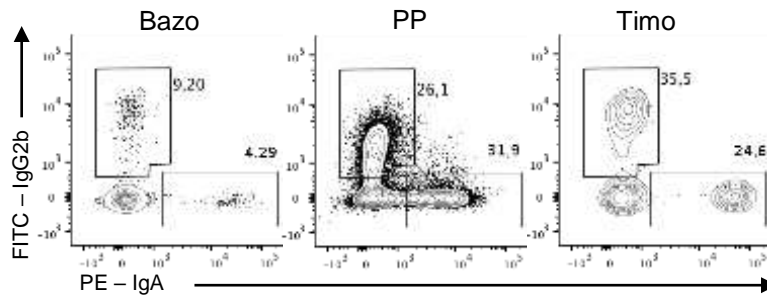


Finalmente, nos pareció relevante responder si la formación de linfocitos B de memoria en el timo es un fenómeno general, independiente de la cepa del ratón. Las dos cepas más usadas para estudios del sistema inmune son las cepas C57BL/6 y BALBc. Estas cepas con fondo genético distinto poseen diferencias en el tipo y magnitud de la respuesta adaptativa celular y humoral en respuesta a patógenos (Trunova et al. 2011; Yagi et al. 2006; Ferreira et al. 2018). Evaluamos los marcadores de memoria anteriormente utilizados en ratones BALBc de la misma edad. En acuerdo con datos de la literatura, nuestros resultados muestran que los ratones BALBc presentan una mayor frecuencia de linfocitos B de memoria en todos los órganos, en comparación con los ratones C57BL/6 (Pellegrini et al. 2007). Aun así, encontramos una clara consistencia con lo observado en ratones C57BL/6. El timo contiene un porcentaje significativamente mayor linfocitos B que han realizado cambio de clase (IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) y que expresa las inmunoglobulinas IgG2b e IgA, en comparación con el bazo. Interesantemente, en comparación con la cepa C57BL/6, las PP de ratones BALBc contiene una mayor proporción de células con cambio de clase, presentando una frecuencia similar a lo observado en el timo (**Fig. 5**). Similarmente, observamos que los linfocitos B del timo fueron los que presentan una mayor proporción de linfocitos B con un fenotipo de memoria CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> en comparación con el bazo. Además, similar a lo que ocurre en la cepa C57BL/6, el timo contiene una proporción significativamente mayor de linfocitos B CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> en comparación con el bazo y las PP (**Fig. 6**).

**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>

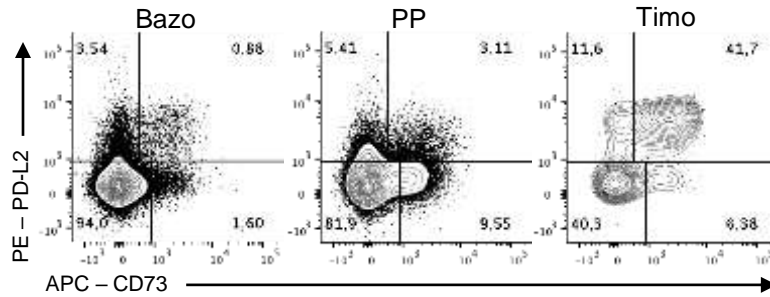


**C** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>

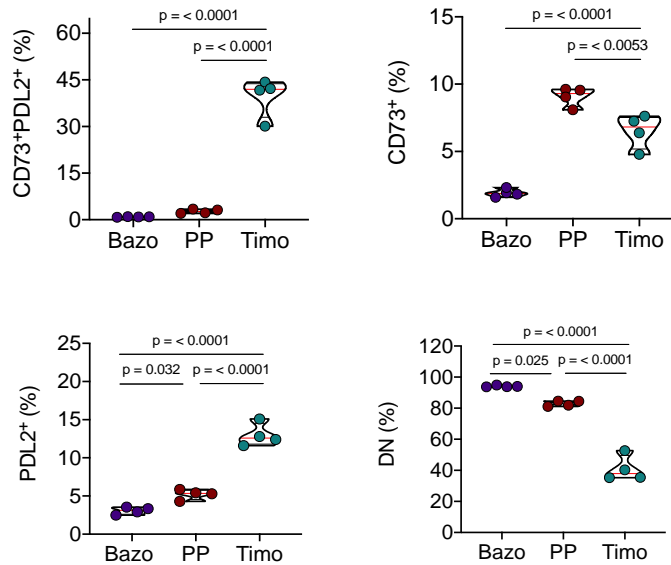


**Figura 5. Los linfocitos B tímicos de ratones BALBc presentan una alta frecuencia de cambio de clase a IgG2b e IgA. (A-B)** Gráficos de citometría de flujo representativos y de frecuencia de los linfocitos B *naive* (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>), IgM<sup>+</sup> (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>), y de cambio de clase (CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>) en bazo (n=6), placas de Peyer (n=6), y timo (n=6) de ratones BALBc. **(C-D)** Gráficos de citometría de flujo y de frecuencia de los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>. Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba ANOVA de una vía o con una prueba Kruskal-Wallis dependiendo del resultado de la prueba de normalidad seguido por una prueba de comparación múltiple según corresponda. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. PP, placas de Peyer; %, frecuencia.

**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>



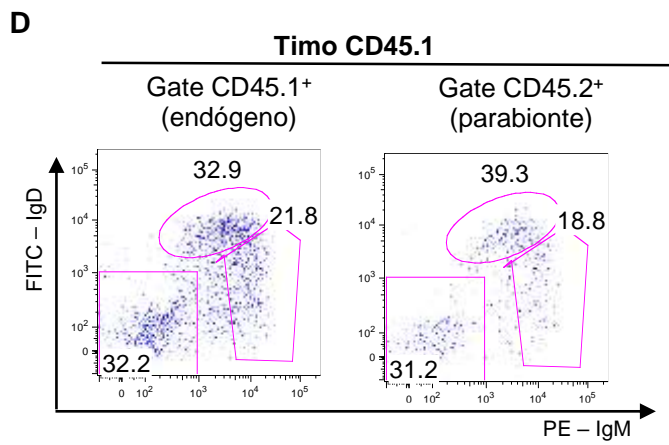
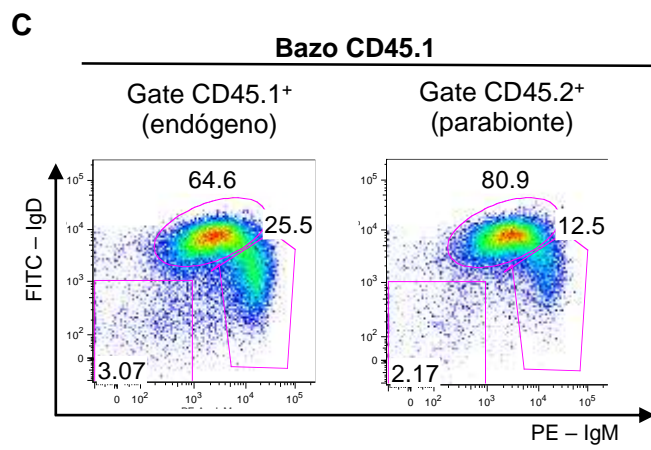
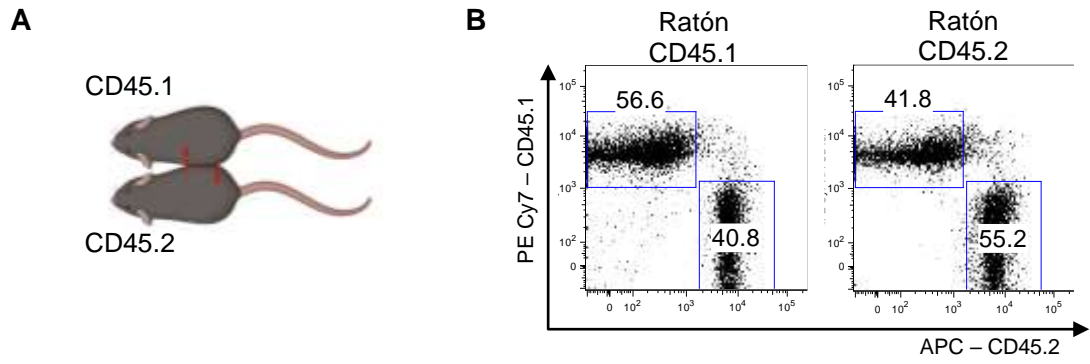
**B**



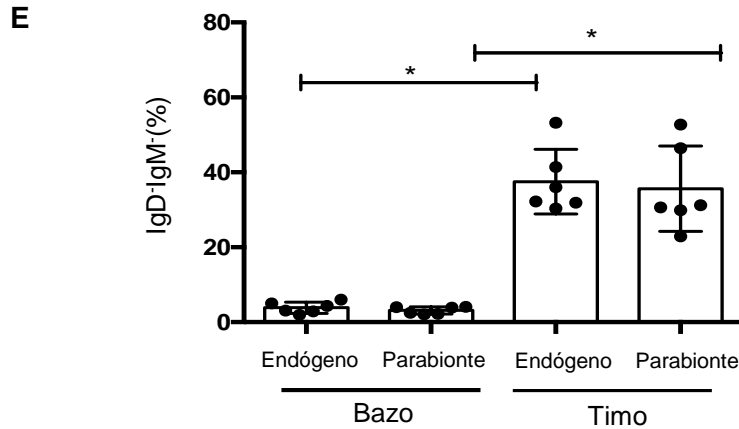
**Figura 6. Los linfocitos B tímicos de ratones BALBc expresan marcadores de memoria CD73 y PD-L2. (A-B)** Gráficos de citometría de flujo representativos y de la frecuencia de los linfocitos B CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>-</sup> en bazo (n=6), placas de Peyer (n=6) y timo (n=6) de ratones BALBc con una mes y medio de edad. Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. PP, placas de Peyer; %, frecuencia.

### **5.3 Los linfocitos B adquieren el fenotipo de cambio de clase de manera local en el timo**

Habiendo demostrado la presencia de linfocitos B de memoria y el estadio previo de linfocitos B de centro germinal en el timo, nos propusimos evaluar si la diferenciación a células de memoria ocurre de manera local o si provienen de la migración de linfocitos B IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> previamente diferenciados en órganos linfoides periféricos hacia el timo. Para ello, usamos un modelo de parabiosis donde se une quirúrgicamente la circulación periférica de dos ratones congénicos que expresan isoformas distintas de la proteína CD45 en las células hematopoiéticas (CD45.1 y CD45.2, respectivamente). Posterior a la cirugía, comparamos el fenotipo de los linfocitos B provenientes del parabionte que migraron al bazo con los que migraron al timo (**Fig. 7A**). Primero, corroboramos que las células linfoides CD45.1 y CD45.2 se equilibraron en la circulación en ambos ratones de las parejas parabiontes (**Fig. 7B**). Al evaluar en el bazo el fenotipo de los linfocitos B provenientes del ratón parabionte, observamos que los linfocitos B son principalmente IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> presentando un fenotipo similar al observado en los linfocitos B del huésped (**Fig. 7C,E**). Interesantemente, dentro de los linfocitos B del parabionte que migran al timo, aproximadamente un tercio realiza cambio de isotipo recapitulando el fenotipo de los linfocitos B endógenos (**Fig. 7D,E**). Este resultado sugiere que una proporción constante de los linfocitos B se diferencian hacia células de memoria localmente en el timo.



*La legenda continua en la próxima página*

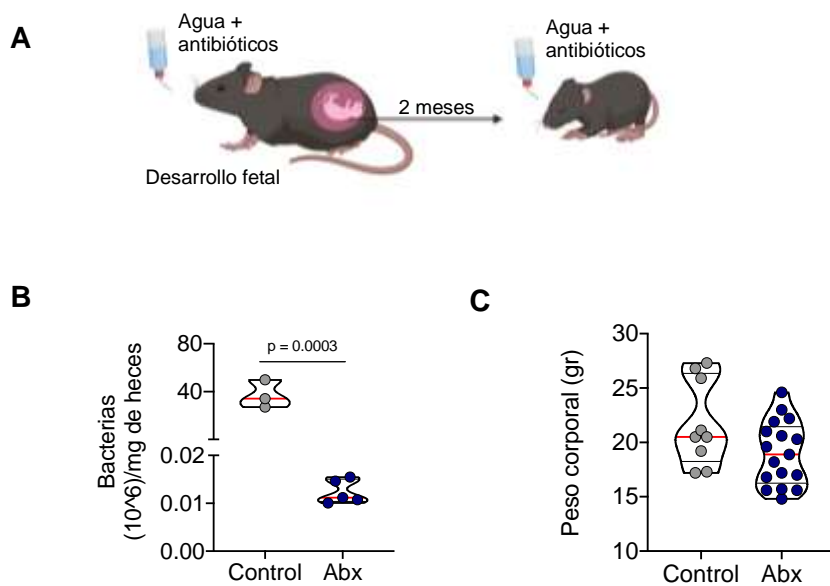


**Figura 7. Los linfocitos B sufren cambio de clase de inmunoglobulina a través de un proceso local en el timo. (A)** Modelo de parabiosis donde un ratón CD45.1<sup>+</sup> se unió quirúrgicamente a un ratón CD45.2<sup>+</sup>. **(B)** Gráficos de citometría de flujo representativo para determinar el origen de las células (endógenas o del parabionte) usando los anticuerpos CD45.1 y CD45.2. **(C)** Gráficos de citometría de flujo representativos de linfocitos B CD45.1/2 *naïve*, de cambio de clase e IgM en el bazo del ratón CD45.1. **(D)** Gráficos de citometría de flujo de linfocitos B CD45.1/2 *naïve*, de cambio de clase e IgM en el timo del ratón CD45.1. **(E)** Gráfico de frecuencia de linfocitos B IgD-IgM<sup>+</sup> de bazo y timo en los ratones huésped y donante. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Se muestran los valores exactos de probabilidad ( $p$ ) significativos. %, frecuencia.



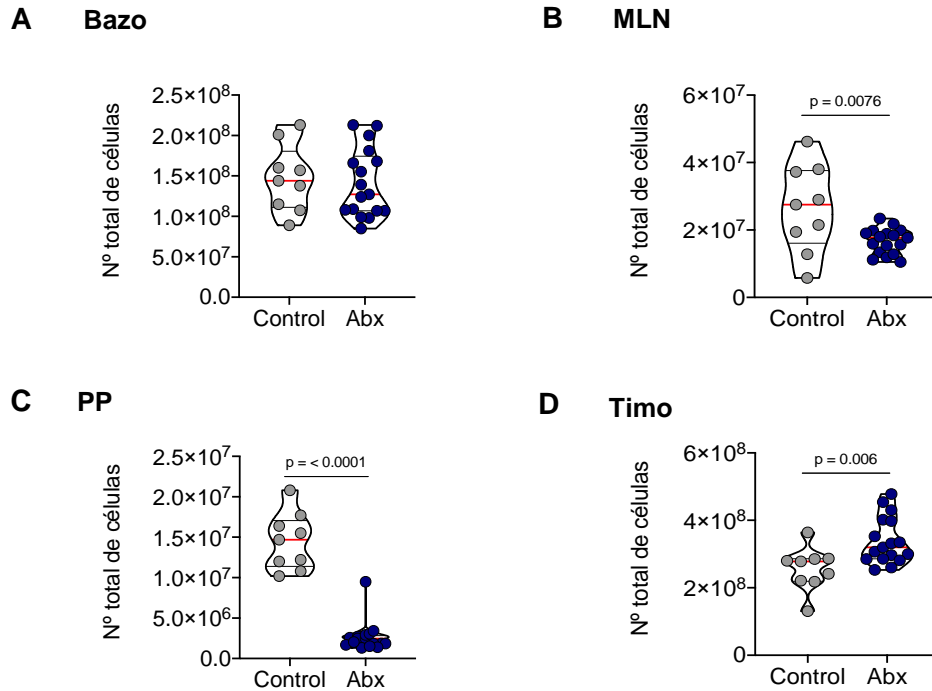
#### **5.4 Los linfocitos B de memoria tímicos no dependen significativamente de la exposición a antígenos externos**

Nuestros resultados del primer objetivo señalan que los linfocitos B presentan un fenotipo de memoria de manera local en el timo y sugieren que ocurre de forma basal sin requerir estimulación de antígenos externos. Por lo tanto, quisimos evaluar cómo se ven afectada la población de linfocitos B de memoria en el timo respecto de los órganos linfoides periféricos como bazo, el ganglio mesentérico (MLN), y PP en un modelo con menor exposición a antígenos de la microbiota intestinal. Usamos un modelo de tratamiento con antibióticos perinatales donde se administró un cóctel de antibióticos vía oral a hembras preñadas y luego a las crías hasta cumplir ocho semanas de vida (**Fig. 8A**). Confirmamos que el tratamiento redujo significativamente el número de bacterias intestinales (**Fig. 8B**), mientras que el peso corporal de los ratones no se vio afectado por el tratamiento con antibióticos (**Fig. 8C**).



**Figura 8. El tratamiento con antibióticos desde el desarrollo perinatal reduce el número de bacterias comensales en heces. (A)** Esquema del tratamiento con antibióticos perinatal en ratones C57BL/6. **(B)** Cuantificación de bacterias fecales mediante citometría de flujo en grupo control (n=9) y grupo con antibióticos (n=17). **(C)** Peso corporal (gr) de los ratones controles y tratados con dos meses de tratamiento. Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. Abx, antibióticos; MLN, ganglio mesentérico; PP, placas de peyers.

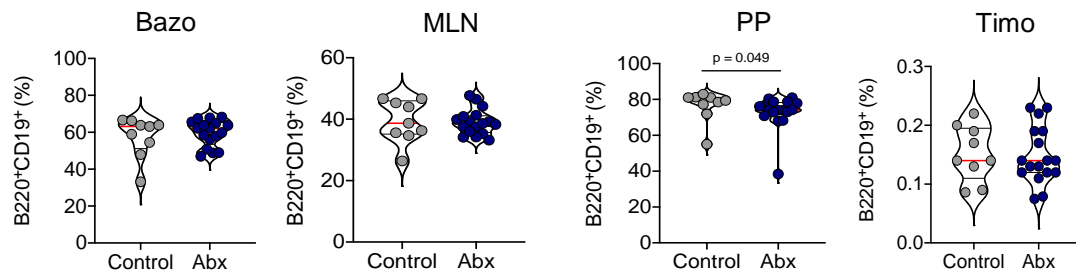
Se ha observado que la administración prolongada de antibióticos puede causar la disminución en el número total de células de algunos órganos linfoides como el bazo, aunque los principalmente afectados son los órganos asociados al intestino (Kennedy et al. 2018). En primera instancia, analizamos el efecto del tratamiento con antibióticos sobre el número de células totales, y frecuencia y número absoluto de linfocitos B de bazo, timo, MLN y PP. De manera esperable, encontramos una reducción significativa en la celularidad del MLN y PP, que son tejidos linfoides asociados al intestino, mientras que en bazo no se observan diferencias. Interesantemente, el número total de células del timo aumenta levemente en el grupo tratado con antibióticos (**Fig. 9**).



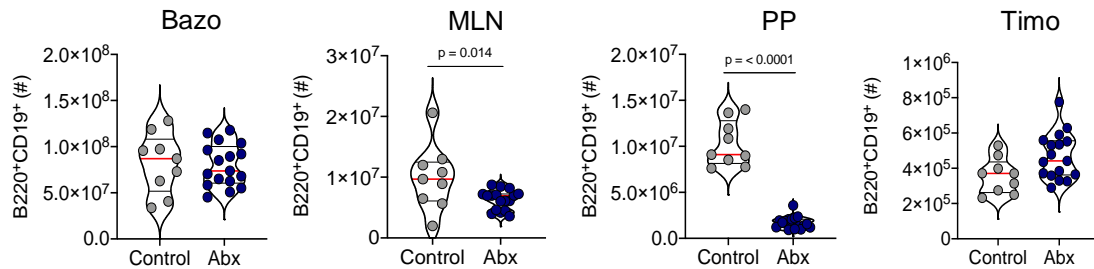
**Figura 9. Reducción del número de células totales en las placas de Peyer y ganglio mesentérico en respuesta a la disminución de los antígenos intestinales provenientes de la microbiota.** Datos de recuento celular obtenidos mediante microscopía óptica de **(A)** bazo, **(B)** ganglio mesentérico, **(C)** placas de Peyer, y **(D)** timo del grupo control (n=9) y grupo con antibióticos (n=17). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. Abx, antibióticos; MLN, ganglio mesentérico; PP, placas de Peyer.

Al analizar los linfocitos B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> se observa una disminución en el número de los linfocitos B del ganglio mesentérico y de las placas de Peyer en el grupo tratado con antibióticos, mientras que los linfocitos B en el timo y bazo no presentan diferencias significativas (**Fig. 10**).

**A** Frecuencia de linfocitos B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>



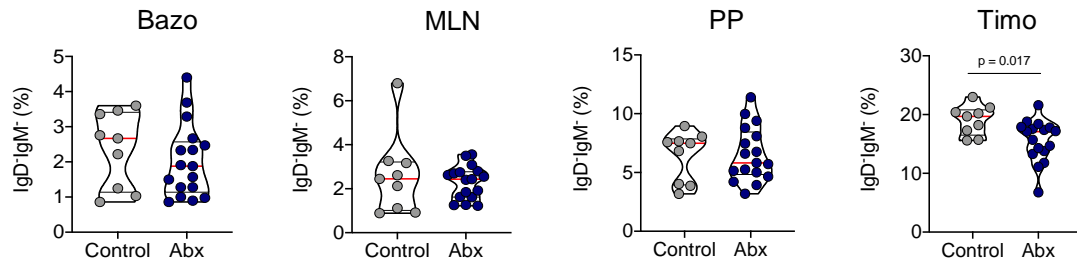
**B** Número de linfocitos B B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>



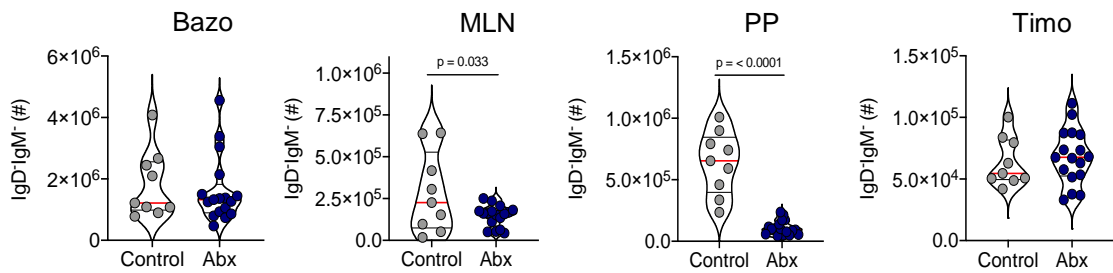
**Figura 10. La frecuencia y el número de los linfocitos B tímicos totales tímicos no se ven afectados por la reducción en la microbiota** Efecto del tratamiento con antibióticos perinatal en la frecuencia (**A**) y número (**B**) de los linfocitos B totales (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) de bazo, ganglio mesentérico, placas de Peyer y timo en el grupo control (n=9) y grupo con antibióticos (n=17). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. Abx, antibióticos; MLN, ganglio mesentérico; PP, placas de Peyer; %, frecuencia; #, número.

Al evaluar el efecto de la reducción de la microbiota intestinal en los linfocitos B de cambio de clase IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>, observamos que el timo presenta una leve reducción en la frecuencia, sin embargo, el número total se mantuvo constante. En contraste, el número de los linfocitos B IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> se ve fuertemente reducido en MLN y PP (**Fig. 11**). Al analizar específicamente el cambio de clase a las inmunoglobulinas IgG2b e IgA, observamos una reducción de la frecuencia y número de los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> en bazo, MLN y PP. En estos órganos también observamos una disminución significativa en el número de linfocitos B IgA<sup>+</sup>. En el timo solo se redujo levemente la frecuencia y el número de los linfocitos B IgA<sup>+</sup> en respuesta a la reducción de la microbiota, mientras que la población IgG2b<sup>+</sup> no se vio afectada (**Fig. 12**).

**A** Frecuencia de linfocitos B de cambio de clase (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7-IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>)

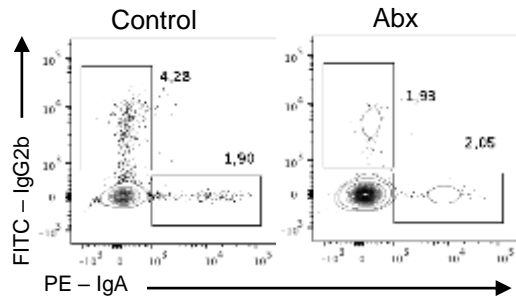


**B** Número de linfocitos B de cambio de clase (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7-IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>)

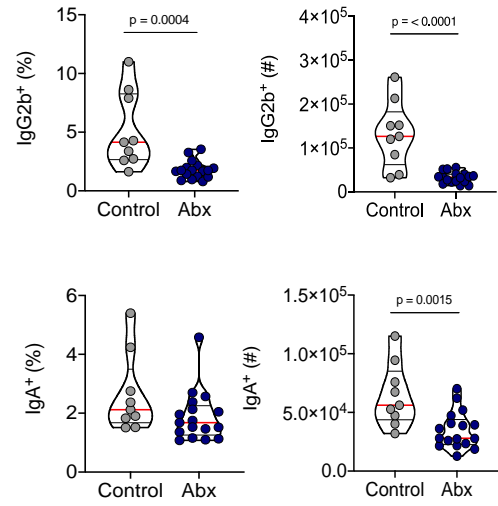


**Figura 11. La reducción de la microbiota intestinal produce una disminución del número de los linfocitos B con cambio de clase totales en el ganglio mesentérico y en las placas de Peyer.** Frecuencia (A) y número (B) de los linfocitos B de cambio de clase (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) de bazo, ganglio mesentérico, placas de Peyer y timo en el grupo control (n=9) y grupo con antibióticos (n=17). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. Abx, antibióticos; MLN, ganglio mesentérico; PP, placas de Peyer; %, frecuencia; #, número.

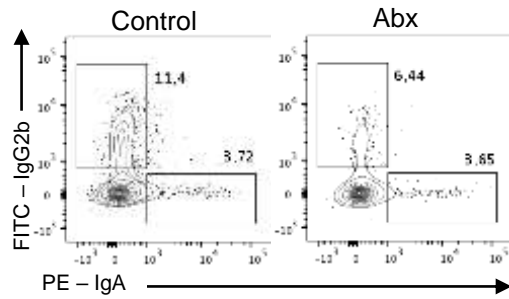
**A Bazo. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



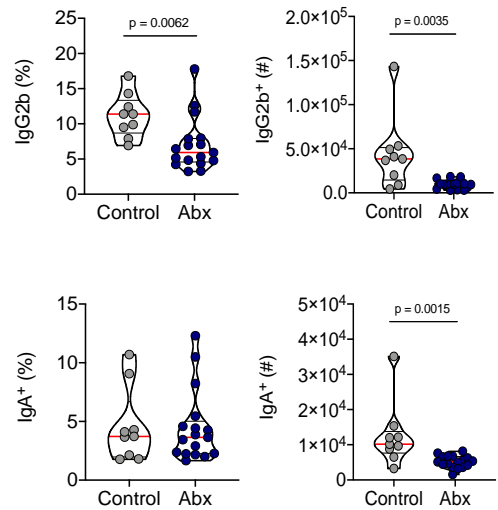
**B**



**C MLN. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



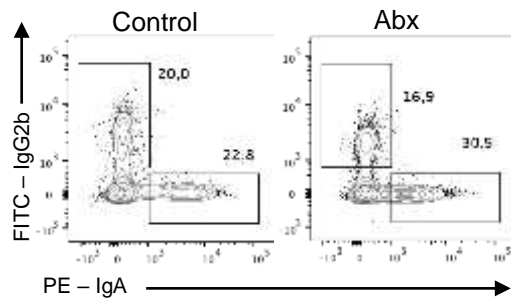
**D**



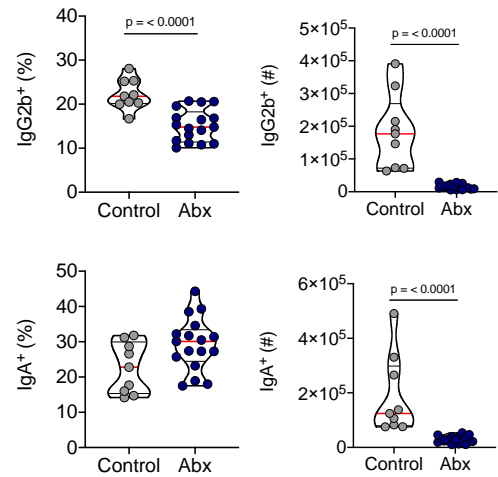
La figura y leyenda continua en la próxima página



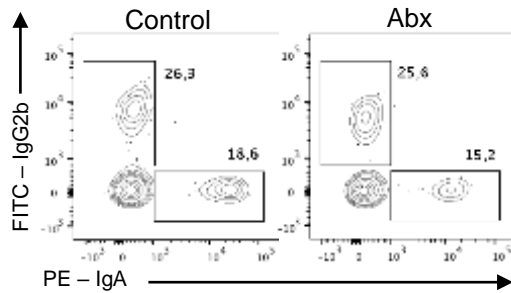
**E PP. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



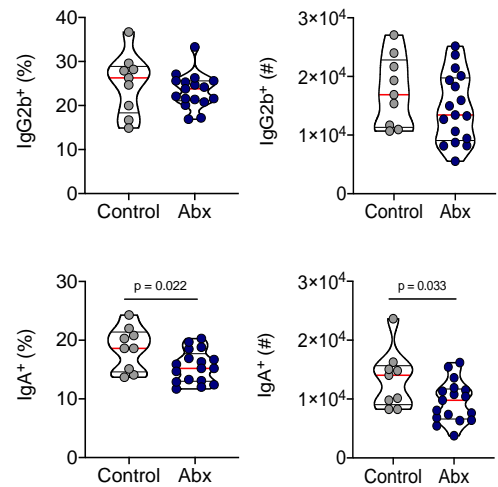
**F**



**G Timo. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



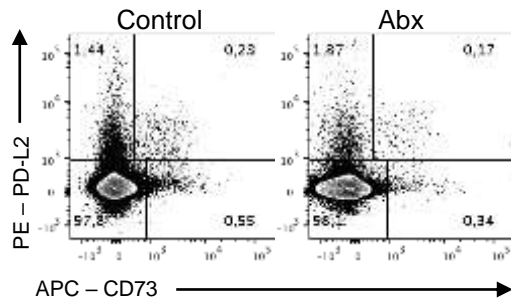
**H**



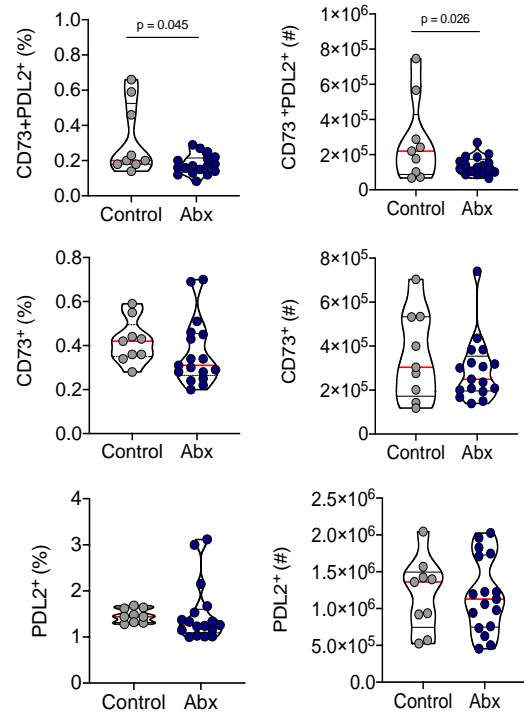
**Figura 12. Cambios en la frecuencia y del número de los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en bazo, MLN, placas de Peyer, y timo en respuesta a la reducción de la microbiota intestinal.** Frecuencia y número de los linfocitos IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en bazo (A-B), ganglio mesentérico (C-D), placas de Peyer (E-F), y timo (G-H) en el grupo control (n=9) y grupo con antibióticos (n=17). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. Abx, antibióticos; MLN, ganglio mesentérico; PP, placas de Peyer; %, frecuencia; #, número.

Consistentemente, al comparar la frecuencia y el número de los linfocitos B de memoria CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> observamos que en el bazo del grupo tratado con antibióticos disminuye la frecuencia y el número total de los linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> (**Fig. 13A**). En MLN y PP, nuevamente se ve una reducción drástica en el número de las tres poblaciones de memoria analizadas (**Fig. 13B-C**). Interesantemente, el timo, si bien se encontró una reducción en la frecuencia de los linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, el número absoluto de las poblaciones de memoria no se ven afectados por el tratamiento (**Fig. 13D**). En conjunto, estos resultados sugieren que, a diferencia de la formación de memoria en la periferia, la diferenciación de linfocitos B de memoria en el timo no es significativamente modulada por la exposición a antígenos exógenos, como lo son los antígenos intestinales.

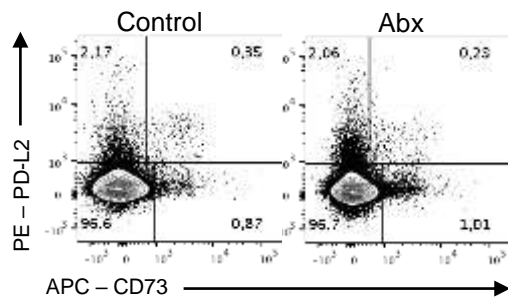
**A Bazo. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



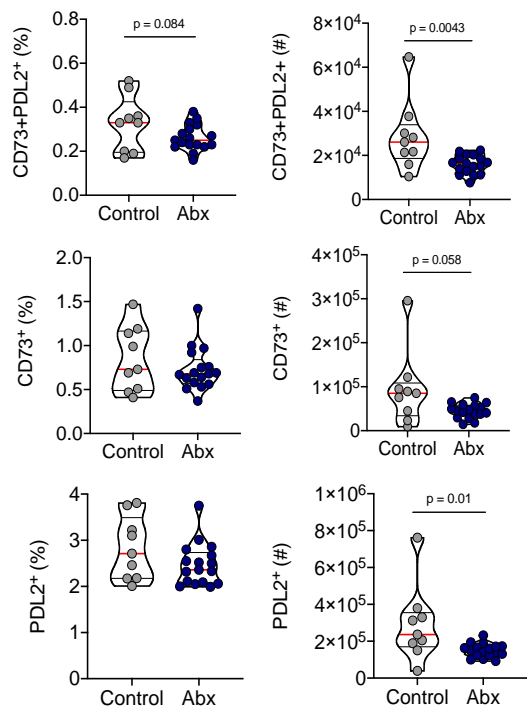
**B**



**C MLN. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**

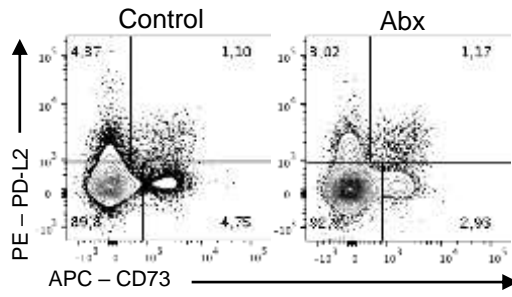


**D**

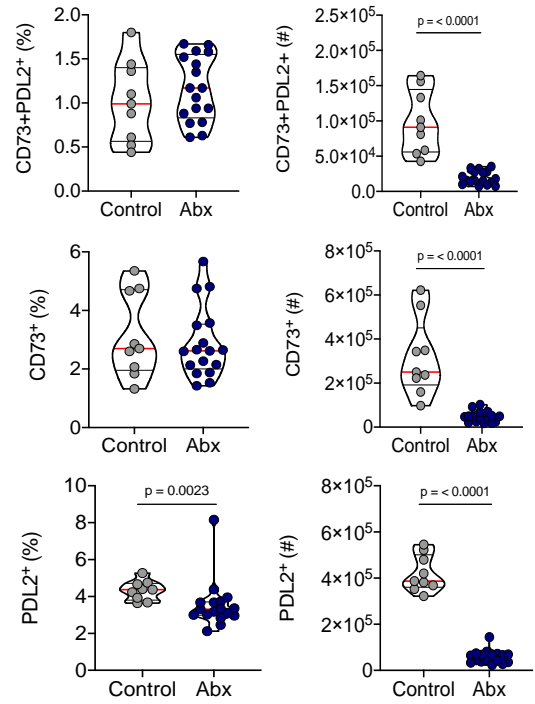


La figura continua en la próxima página

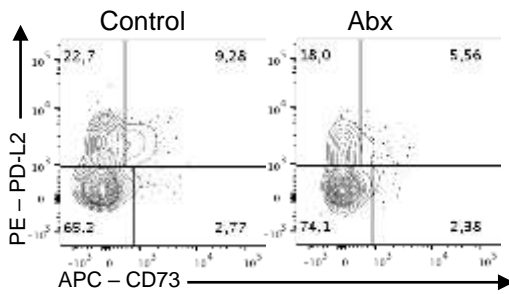
**E PP. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



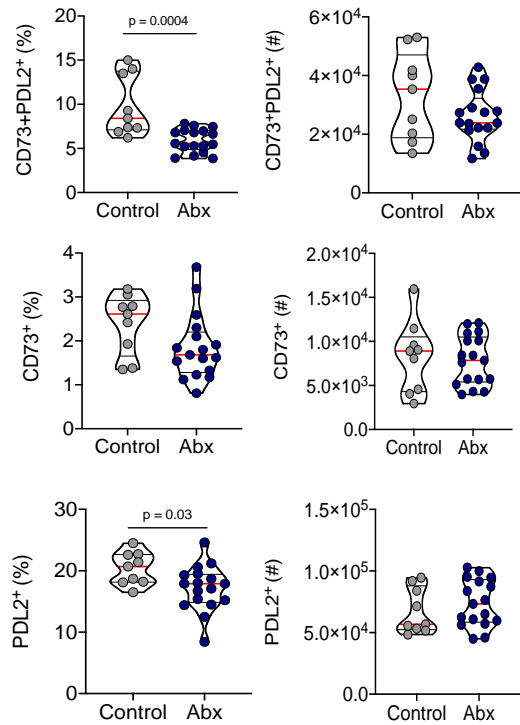
**F**



**G Timo. Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>**



**H**



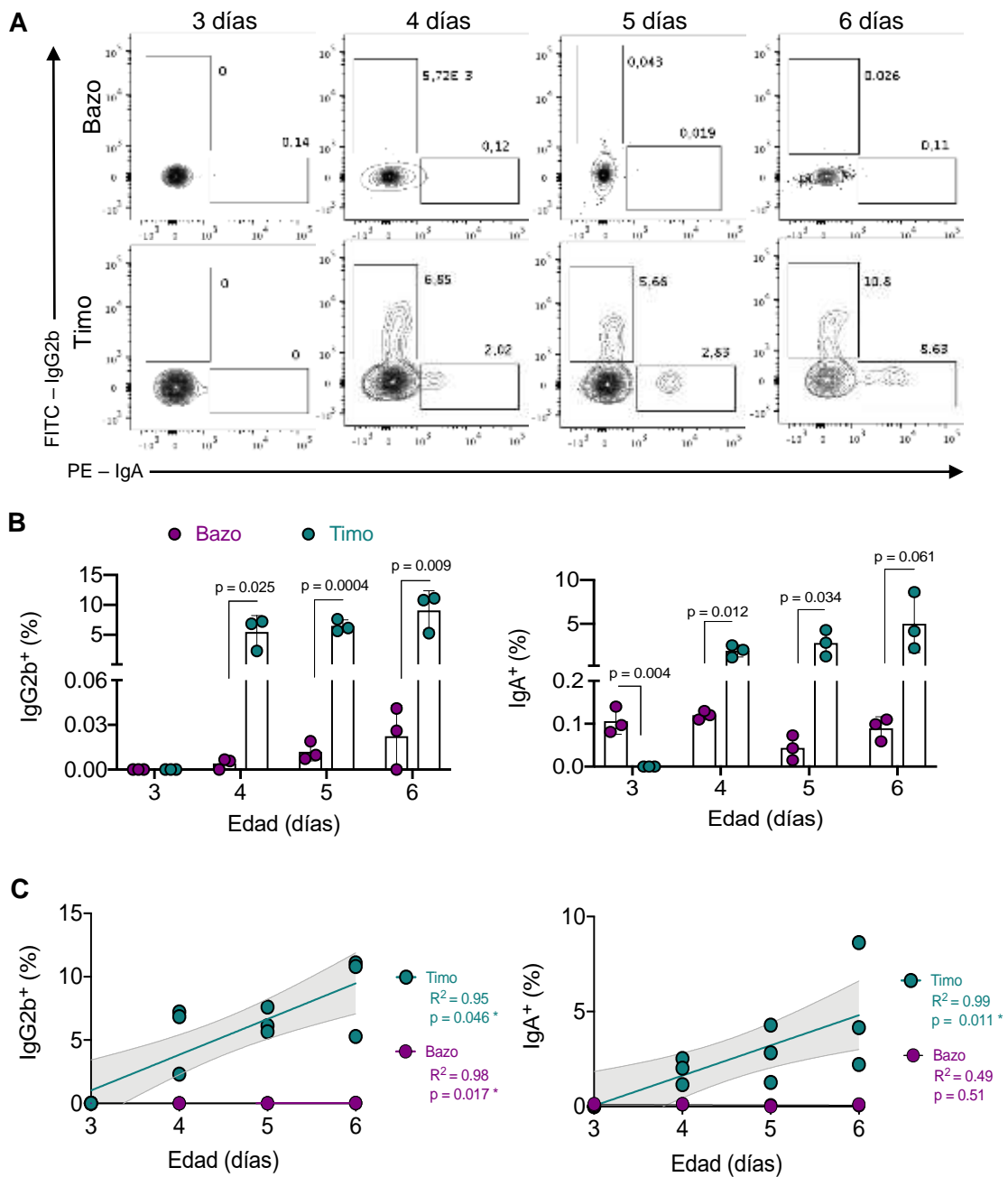
La leyenda de la figura continua en la próxima página

**Figura 13. La reducción de la microbiota intestinal no afecta el número de los linfocitos B de memoria que expresan CD73 y PD-L2 en el timo.** Frecuencia y número de los linfocitos B CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>, y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> en bazo (**A-B**), ganglio mesentérico (**C-D**), placas de Peyer (**E-F**), y timo (**G-H**) en los grupos control (n=9) y antibióticos (n=17). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. Abx, antibióticos; MLN, ganglio mesentérico; PP, placas de Peyer; %, frecuencia; #, número.

## **5.5 La diferenciación de los linfocitos B tímicos comienza en la etapa neonatal y antecede a la formación de linfocitos B de memoria en la periferia**

Los resultados presentados anteriormente permiten hipotetizar que, de manera basal, existen señales en el timo que promueven la diferenciación de linfocitos B de memoria siendo un proceso independiente de la formación de memoria periférica. Por esta razón, quisimos evaluar si la diferenciación de linfocitos B de memoria en el timo ocurre en las etapas tempranas de vida, previo al desarrollo de respuestas adaptativas en la periferia. Para ello, hicimos un seguimiento de los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en el bazo y timo en ratones neonatos de los tres a seis días de vida. Observamos que ambas poblaciones de linfocitos B son prácticamente indetectables en el bazo de los ratones neonatos. Interesantemente, en el timo los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> son detectados a partir de los cuatro días de nacidos, presentando frecuencias significativamente mayores en comparación con los linfocitos B del bazo durante la etapa neonatal (**Fig. 14 A-B**). En ambas poblaciones IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> observamos una correlación positiva entre la edad y la frecuencia de esas células en el timo, mientras que en el bazo solo la población IgG2b<sup>+</sup> aumenta de manera edad-dependiente (**Fig. 14C**). Nuestros resultados muestran que, en el timo, la diferenciación de células de memoria con cambio de clase a IgG2b e IgA comienza a ocurrir tempranamente durante los primeros días de vida, incluso antes de que este proceso sea detectable en órganos linfoides secundarios como el bazo. Esto

nuevamente apoya que corresponde a un proceso independiente de la formación de memoria convencional en la periferia.

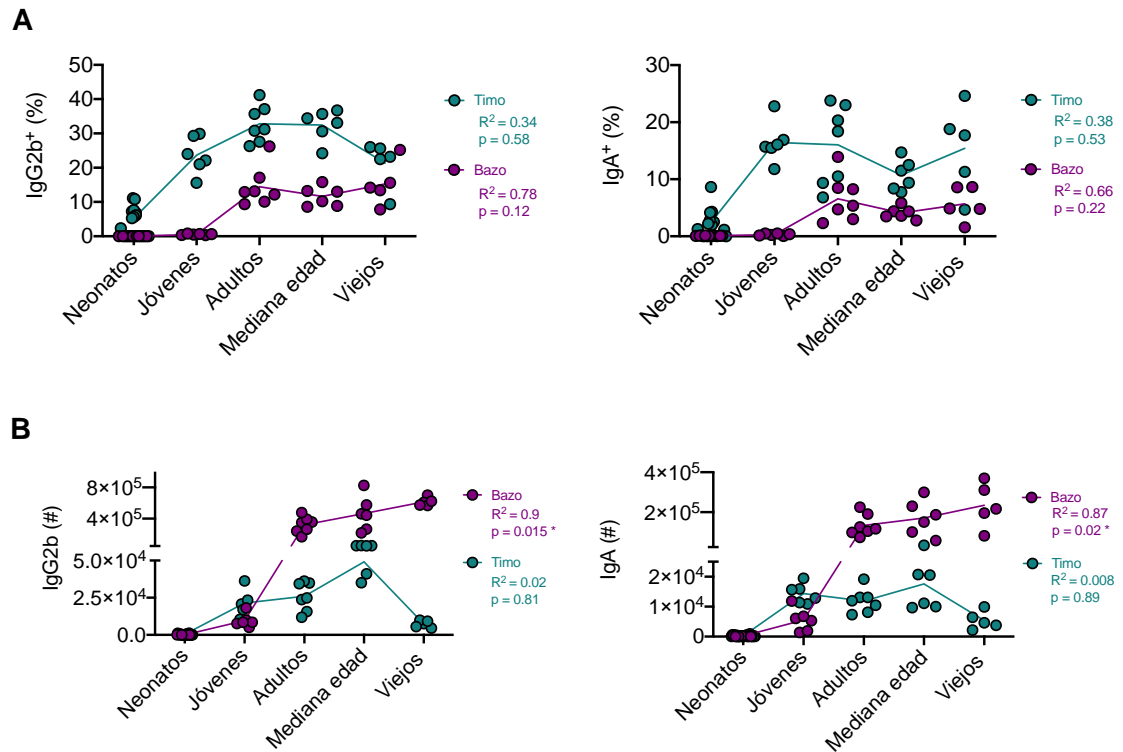


**Figura 14. Los linfocitos B tímicos IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> son detectados en los primeros días de vida. (A)** Gráficos de citometría de flujo representativos de la frecuencia de los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>. Gráficos de frecuencia (B) y de correlación (C) en ratones neonatos con 3 a 6 días de nacidos. Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas de cada día se calcularon con una prueba-t múltiple mientras que los valores de R<sup>2</sup> y de probabilidad se calcularon con una prueba de correlación de Pearson o Spearman según el resultado de sus pruebas de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. (p < 0.05 \*), datos significativos.



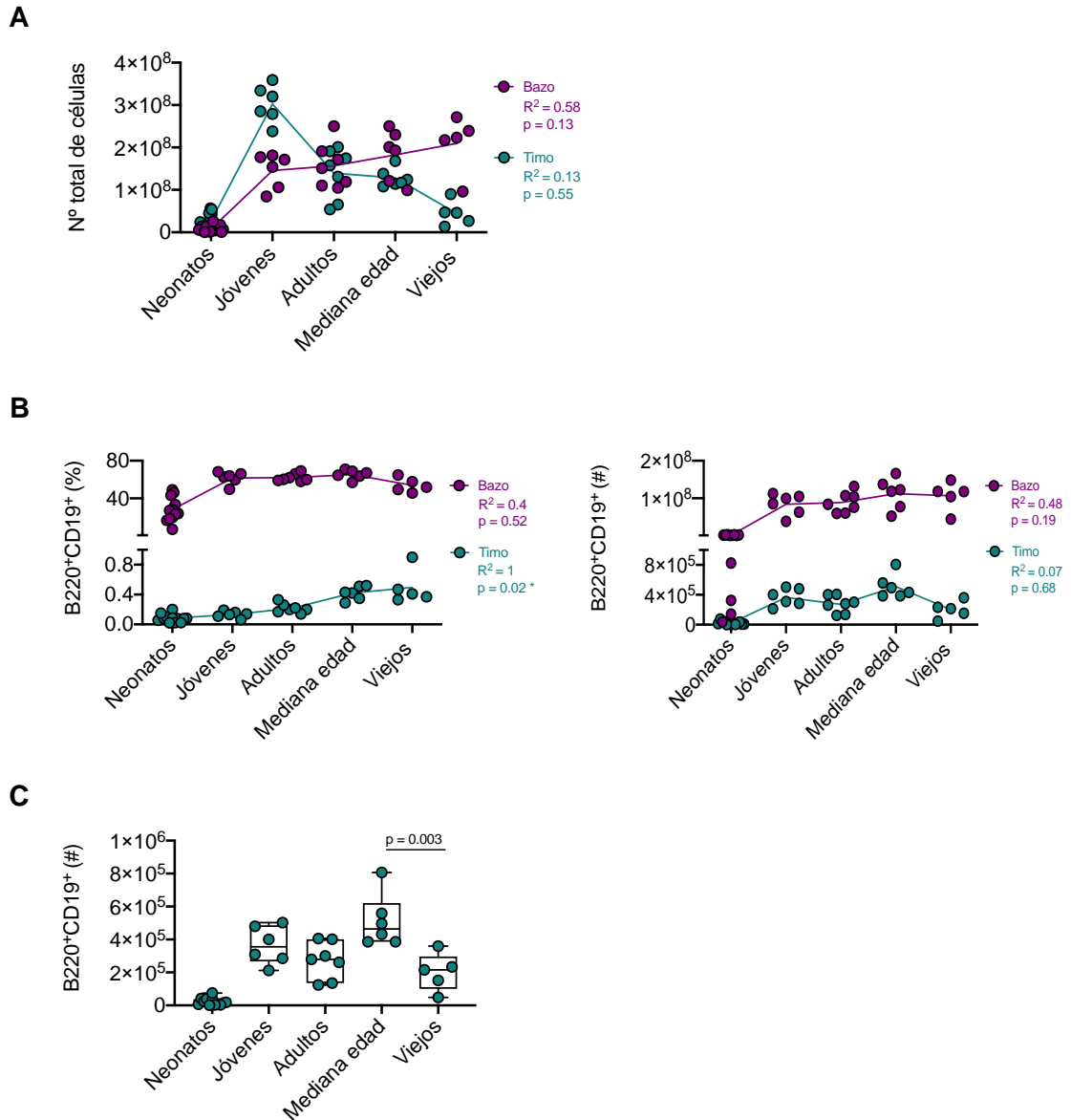
## **5.6 La acumulación progresiva de los linfocitos B de memoria en la periferia durante el envejecimiento no se ve reflejada en el timo**

Durante el envejecimiento, ocurre una acumulación progresiva de linfocitos B de memoria en la circulación y órganos linfoides secundarios como resultado de una exposición continua a diferentes antígenos externos (Scholz et al. 2013). Por ello, quisimos analizar de manera longitudinal la proporción de linfocitos B con cambio de clase de Ig y subpoblaciones de memoria definidas mediante la expresión de CD73 y PD-L2 en bazo y timo de ratones, los cuales se dividieron en los siguientes grupos etarios: neonatos (3 – 6 días), jóvenes (2 – 12 semanas), adultos (3 – 9 meses), mediana edad (10 – 14 meses) y viejos (>18 meses). En la **figura 15** se muestra que durante el envejecimiento, en el bazo se observa un aumento progresivo en el número de los linfocitos B con cambio de clase a IgG2b e IgA, alcanzando el mayor número de ambas inmunoglobulinas en ratones viejos. En cambio, en el timo no se ve una correlación entre los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> y la edad, por el contrario, su número presenta una disminución durante la vejez. Interesantemente, el timo durante la etapa neonatal y juvenil de los ratones contiene un mayor número total de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en comparación con el bazo mientras que en edades posteriores el bazo alberga un mayor número de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> (**Fig. 15B**).



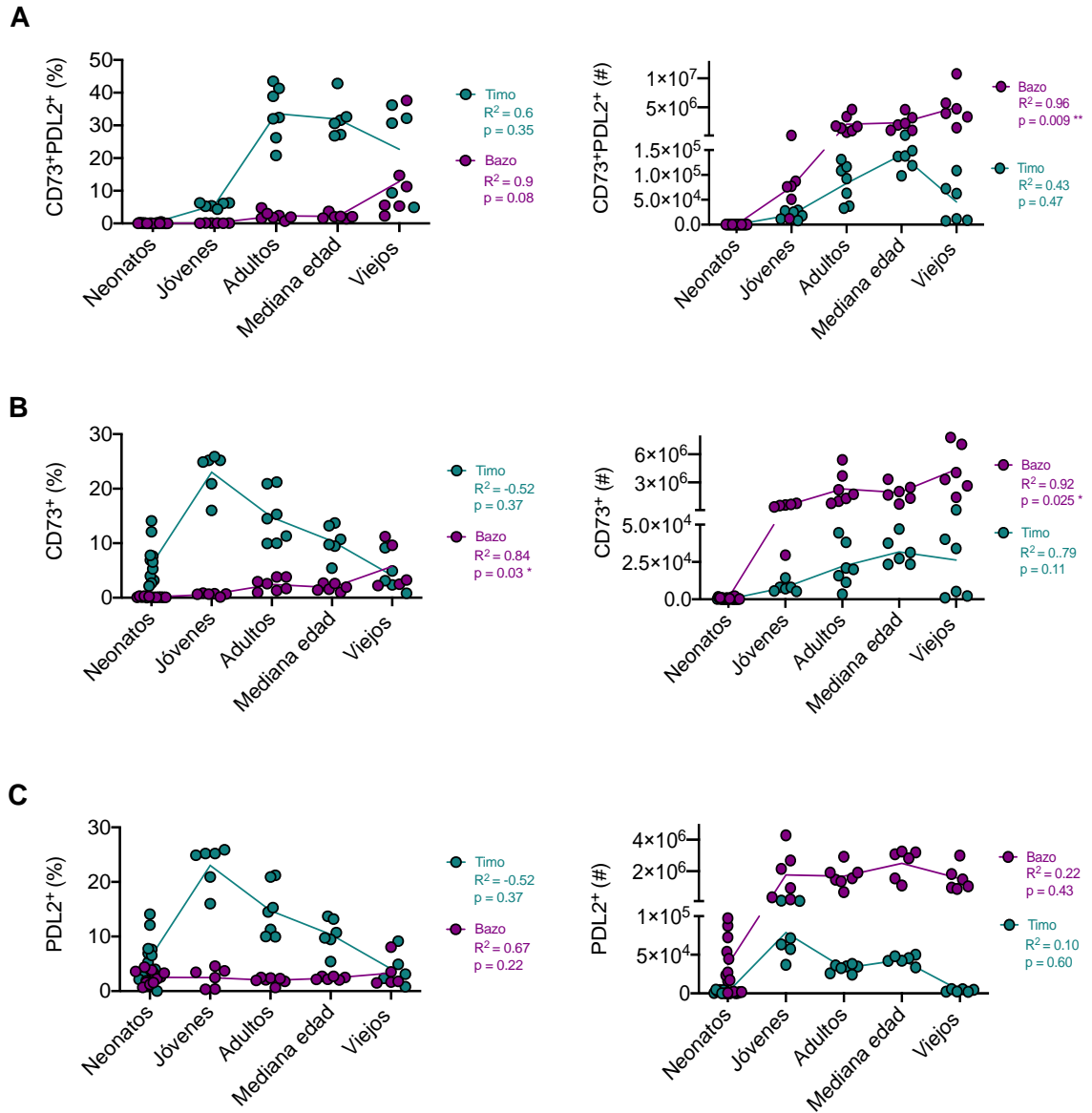
**Figura 15. Los linfocitos B tímicos  $\text{IgG2b}^+$  e  $\text{IgA}^+$  no se acumulan durante el envejecimiento.** Gráficos de frecuencia (A) y número (B) de linfocitos B  $\text{IgG2b}^+$  e  $\text{IgA}^+$  de bazo y timo de ratones neonatos (3 – 6 días), jóvenes (2 – 12 semanas), adultos (3 – 9 meses), mediana edad (10 – 14 meses) y viejos (>18 meses). Los valores de  $R^2$  y de probabilidad se calcularon con una prueba de correlación de Pearson o Spearman según el resultado de sus pruebas de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad ( $p < 0.05^*$ ), datos significativos.

El timo sufre un proceso fisiológico de involución durante el envejecimiento caracterizado por una reducción de su tamaño y celularidad. Dado que estas alteraciones podrían incidir en los cambios observados en los animales viejos, también analizamos el porcentaje y número total de linfocitos B de bazo y timo en todas las edades. Efectivamente, observamos una reducción en el número de células en el timo de ratones envejecidos (**Fig. 16A**). Asociado a esto, se observa que el número de linfocitos B tímicos disminuye en ratones viejos, mientras que su frecuencia relativa aumenta, probablemente debido a la pérdida abrupta de timocitos durante el proceso de involución tímica (Aspinall & Andrew 2000; Thomas et al. 2020) (**Fig. 16A-C**). Estos resultados indican que los cambios observados en el número de los linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> tímicos reflejan lo que ocurre con el número de linfocitos B totales B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> en el timo durante el proceso de involución (**Fig. 16C**). En bazo, la frecuencia y el número de los linfocitos B totales se mantuvieron constantes en todos los grupos etarios a diferencia de la acumulación observada en las poblaciones de cambio de clase durante el envejecimiento (**Fig. 16A-B**).



**Figura 16. El número de linfocitos B tímicos B220+CD19+ disminuyen en ratones viejos.** Gráficos de frecuencia (A) y número (B) de linfocitos B B220+CD19+ de bazo y timo de ratones neonatos (3 – 6 días), jóvenes (2 – 12 semanas), adultos (3 – 9 meses), mediana edad (10 – 14 meses) y viejos (>18 meses). (C) Gráfico de número de linfocitos B totales tímicos. Los valores de  $R^2$  y de probabilidad se calcularon con una prueba de correlación de Pearson o Spearman según el resultado de sus pruebas de normalidad, mientras que las diferencias estadísticas de los linfocitos B tímicos entre grupos etarios se calcularon con una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de comparación múltiple. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. ( $p < 0.05^*$ ), datos significativos.

Cuando evaluamos cambios en las poblaciones de memoria según la expresión de los marcadores CD73 y PD-L2 durante el envejecimiento, observamos que, en el bazo, la mayor frecuencia de las poblaciones CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup> se observa en ratones viejos y sólo la población de linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> presentó una correlación significativa con la edad. Por el contrario, en el timo las tres poblaciones de memoria analizadas presentan su máxima frecuencia en los ratones jóvenes y adultos, para luego progresivamente disminuir durante la edad (**Fig. 17**). Estos resultados indican que los linfocitos B de memoria en el timo no siguen un patrón de acumulación asociado al envejecimiento similar a lo que ocurre en órganos linfoides secundarios periféricos. Todo ello apunta a que la formación de células de memoria tímicas no depende de la activación y generación de linfocitos B de memoria periféricos en respuesta a la continua exposición del organismo a antígenos externos.



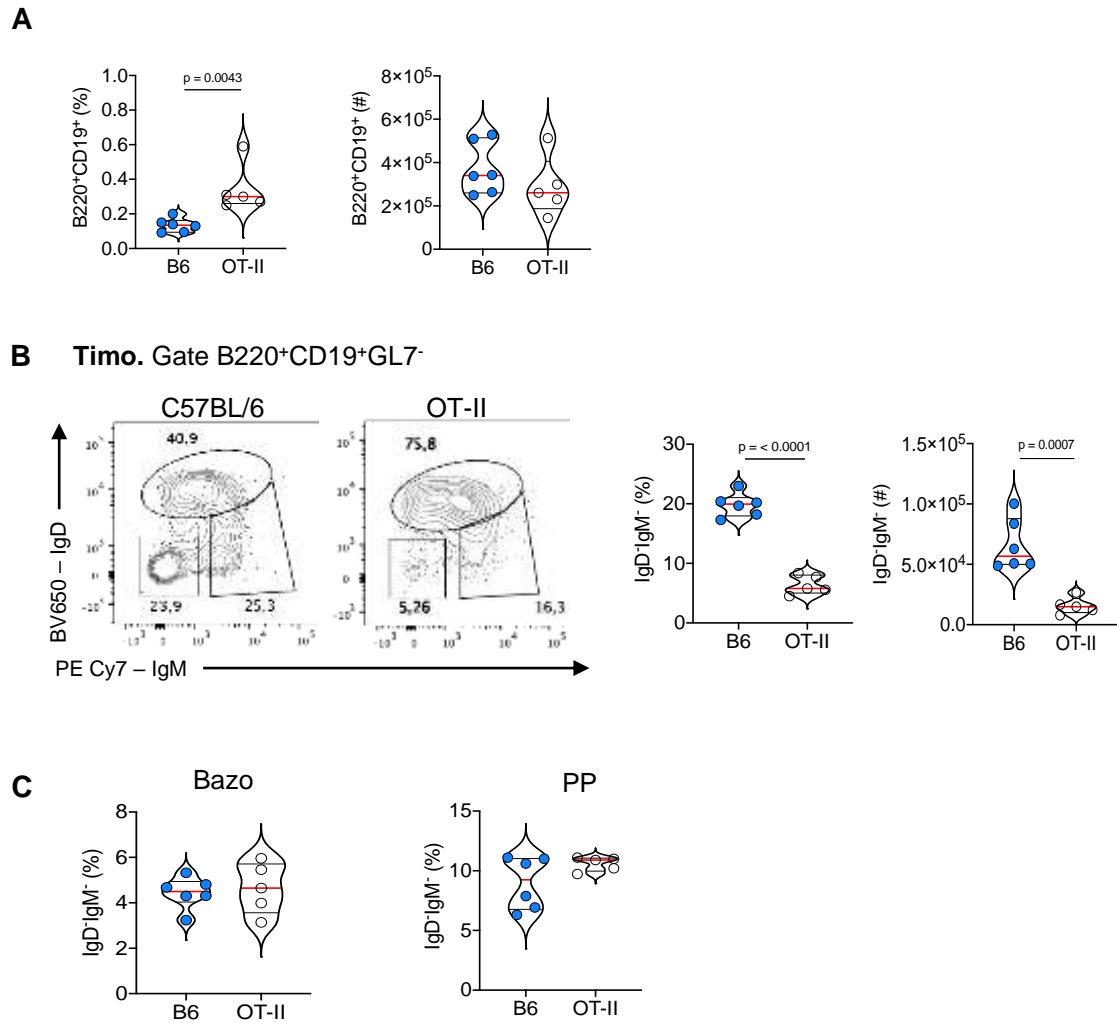
**Figura 17. La frecuencia de los linfocitos B tímicos que expresan los marcadores de memoria CD73 y PD-L2 disminuyen durante el envejecimiento.** Gráficos de frecuencia de linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> (A), CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> (B), y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup> (C) de bazo y timo de ratones neonatos (3 – 6 días), jóvenes (2 – 12 semanas), adultos (3 – 9 meses), mediana edad (10 – 14 meses) y viejos (>18 meses). Los valores de R<sup>2</sup> y de probabilidad se calcularon con una prueba de correlación de Pearson o Spearman según el resultado de sus pruebas de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. (p < 0.05 \*), datos significativos.

## 5.7 La interacción entre los linfocitos B y T modula la adquisición del fenotipo de memoria en los linfocitos B tímicos

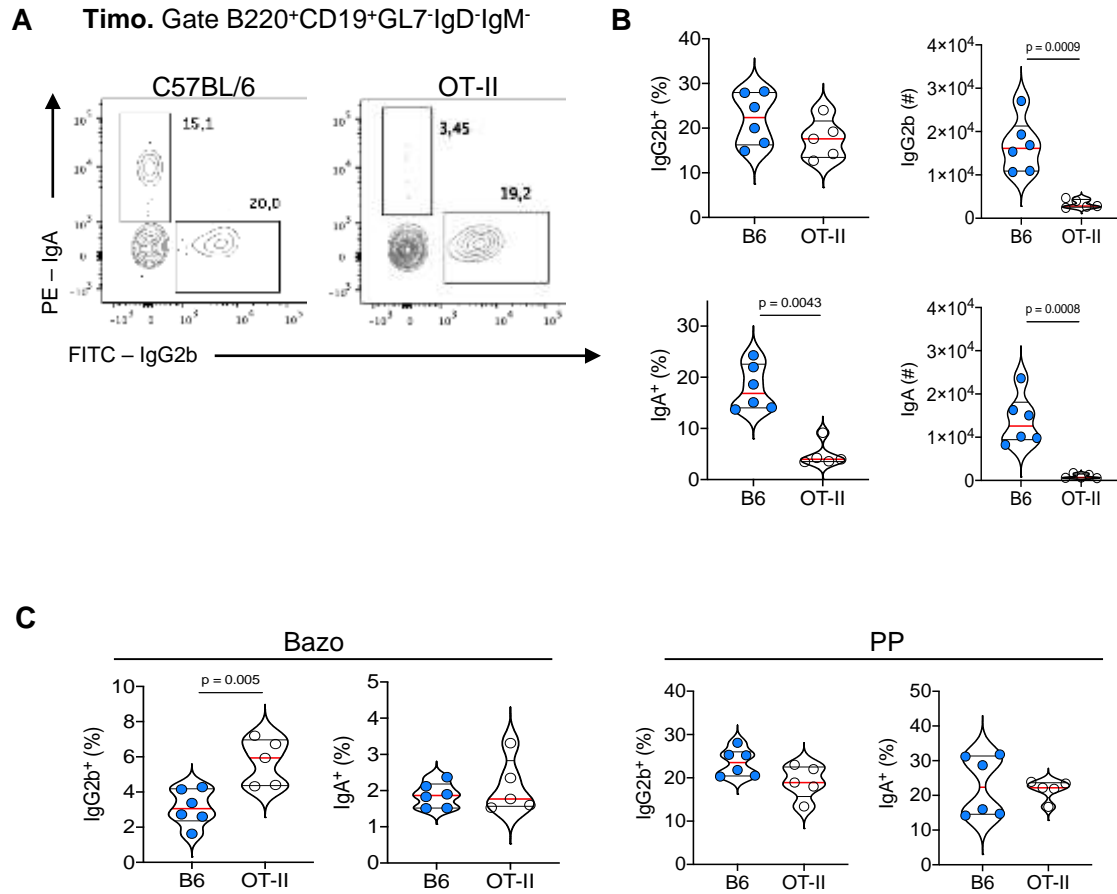
Todos nuestros resultados anteriores indican que los linfocitos B del timo se diferencian a células de memoria de manera independiente de la formación de memoria en la periferia, sugiriendo que existen señales locales en el timo que son necesarias para que los linfocitos B tímicos presenten el fenotipo de memoria. Con el objetivo de determinar si la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inmaduros es necesaria para que los linfocitos B tímicos expresen el fenotipo de memoria, usamos el modelo de ratón OT-II, donde se ve impedida esta interacción, dado que la especificidad del TCR de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> está restringida a un péptido de la proteína ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>) –el cual no es un autoantígeno–. Evaluamos en los linfocitos B de timo y bazo de ratones OT-II la expresión de inmunoglobulinas y los marcadores de memoria, y la comparamos con los linfocitos B de ratones C57BL/6. Nuestros resultados muestran que el timo de ratones OT-II presenta una drástica reducción tanto en frecuencia como número total de linfocitos B que han realizado cambio de isotipo (IgD-IgM<sup>-</sup>) (**Fig. 18B**), lo cual no se debe a diferencias en el número de linfocitos B totales en el órgano (**Fig. 18A**). Asimismo, el número total de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> está significativamente reducido en ratones OT-II (**Fig. 19A**). Interesantemente, observamos que la proporción de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> es similar en ambos grupos, mientras que la proporción de IgA<sup>+</sup> es significativamente menor en ratones OT-II, lo cual sugiere que la diferenciación hacia IgA está

particularmente afectada (**Fig. 19A**). Cabe notar que estas diferencias se restringen al timo, ya que en los linfocitos B de bazo y placas de Peyer de los ratones OT-II no hay disminución en los linfocitos B con cambio de isotipo totales, IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> (**Fig. 18C, 19C**). Al evaluar los marcadores de memoria, observamos que el timo de ratones OT-II presentan una menor frecuencia de los tres subtipos de linfocitos B de memoria CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>, y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup> mientras que esta reducción no se observa en el bazo ni placas de Peyer (**Fig. 20**). En conjunto, observamos una menor formación de linfocitos B de memoria en el timo de ratones OT-II, lo cual apoyaría que la expresión de marcadores asociados a memoria en el timo requiere de la interacción entre los linfocitos B y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en desarrollo.



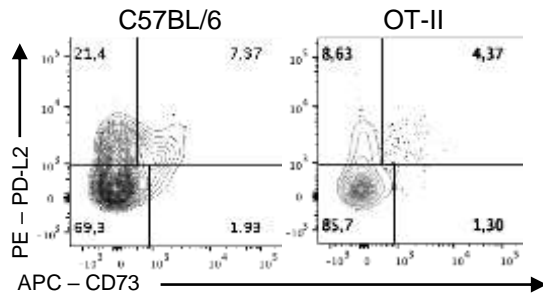


**Figura 18. El cambio de clase en los linfocitos B tímicos requiere la interacción de los linfocitos B con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inmaduros. (A)** Gráficos de frecuencia y número de los linfocitos B (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) presentes en el timo de ratones C57BL/6 (B6) y OT-II. **(B)** Gráficos de citometría de flujo representativos, de frecuencia y número de linfocitos B que presentan cambio de isotipo (IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) en timo de ratones C57BL/6 y OT-II. **(C)** Gráficos de frecuencia de linfocitos B IgD<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup> en bazo y placas de Peyer de ratones C57BL/6 (n=6) y OT-II (n=5). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. B6, ratones C57BL/6; PP, placas de Peyer.

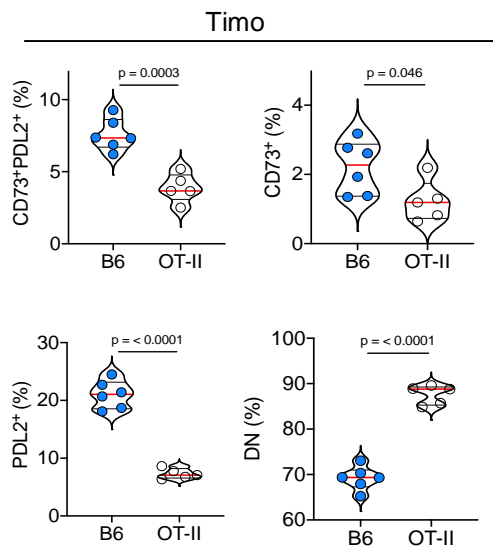


**Figura 19. La interacción entre los linfocitos B y los timocitos promueve la diferenciación de los linfocitos B tímicos a células IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup>.** (A) Gráficos de citometría de flujo representativos de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> tímicos de ratones C57BL/6 (B6) y OT-II. (B) Gráficos de frecuencia y número de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en timo de ratones C57BL/6 y OT-II. (C) Gráficos de frecuencia de linfocitos B IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en bazo y placas de Peyer de ratones C57BL/6 (n=6) y OT-II (n=5). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada o Mann-Whitney según el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. B6, ratones C57BL/6; PP, placas de Peyer.

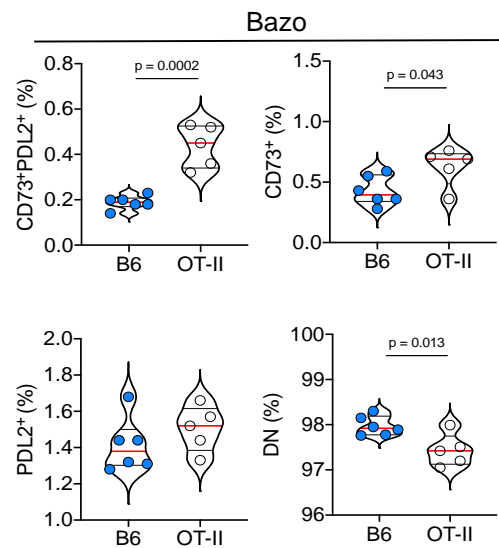
**A** Gate B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>-</sup>



**B**



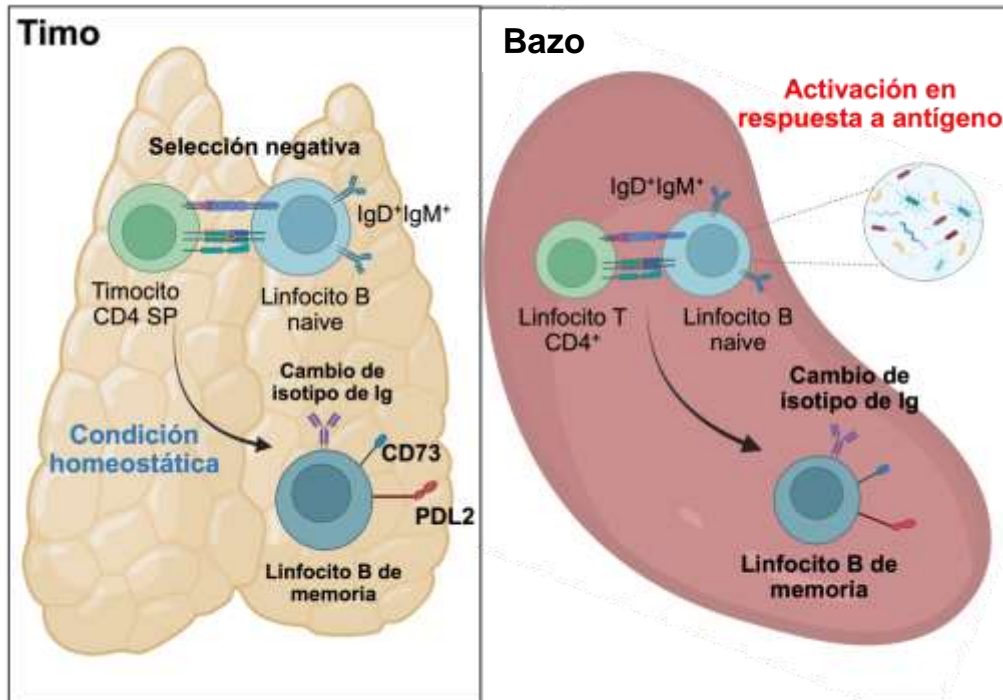
**C**



**Figura 20. Los linfocitos B tímicos de ratones OT-II presentan una disminución en la diferenciación a células de memoria con expresión de CD73 y PD-L2. (A)** Gráficos de citometría de flujo representativos en timo. **(B)** Frecuencia de los linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> en timo de ratones C57BL/6 (n=6) y OT-II (n=5). **(C)** Frecuencia de los linfocitos B CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>, y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> en bazo de ratones C57BL/6 (n=6) y OT-II (n=5). Cada ratón se encuentra representado por un punto. Las diferencias estadísticas se calcularon con una prueba-t no pareada por el resultado de la prueba de normalidad. Se muestran los valores exactos de probabilidad (p) significativos. B6, ratones C57BL/6.

## 6. DISCUSIÓN

La formación de linfocitos B de memoria y su rol en la respuesta adaptativa humoral ha sido intensamente estudiada y caracterizada principalmente en los órganos linfoides secundarios en respuesta a antígenos externos. En este trabajo, exploramos un proceso distinto de diferenciación de linfocitos B de memoria que ocurre en el timo y que estaría asociado a su rol en la selección negativa de timocitos. Aquí, nosotros confirmamos que, de manera basal, el timo contiene una fracción significativa de linfocitos B que han realizado cambio de isotipo, y mostramos además que expresan marcadores fenotípicos característicos de células de memoria (**Fig. 21**). Nuestros resultados muestran que al restringir la formación de linfocitos B de memoria en la periferia, su número no se ve significativamente reducido en el timo. Notablemente, mostramos que la formación de linfocitos B de memoria en el timo comienza tempranamente en los primeros días de vida y antecede a su formación en el bazo. Por último, encontramos en el modelo murino OT-II, en el cual no ocurre selección negativa, la frecuencia y número de los linfocitos B de memoria tímicos se ven drásticamente reducidos. En conjunto, este trabajo aporta nuevas evidencias que apoyan que en el timo los linfocitos B sufren un proceso atípico de diferenciación de memoria, que ocurre de manera local, y sería estimulado por la interacción con los linfocitos T inmaduros durante la presentación de autoantígenos. Es decir, este proceso es independiente de la activación y diferenciación de linfocitos B a células de memoria en la periferia.



**Fig. 21. Modelo propuesto de la formación de linfocitos B de memoria tímicos.** Nuestros datos muestran que los linfocitos B residentes del timo sufren un proceso atípico de diferenciación hacia células de memoria. En el timo, los linfocitos B presentan características fenotípicas de memoria de manera local y bajo condiciones homeostáticas, debido a la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en desarrollo, proceso no influenciado por la exposición a antígenos y que ocurre tempranamente desde el periodo neonatal. En contraste, los linfocitos B de la periferia (esquematisados en el bazo), se diferencian de manera convencional a células de memoria debido a la activación de los linfocitos B por el reconocimiento de antígenos exógenos.

Si bien, los linfocitos B del timo han sido estudiados hace décadas, no fue hasta años recientes que se describió que una proporción significativa corresponde a células con cambio de isotipo de inmunoglobulina (Perera et al., 2013, 2016; Yamano et al., 2015). En acuerdo con este antecedente, aquí mostramos que, en dos cepas diferente de ratón, en promedio, aproximadamente un 25% de los linfocitos B tímicos presentan cambio de isotipo. En ambas cepas, la proporción de linfocitos B con cambio de isotipo es significativamente mayor con respecto al

bazo y, notablemente, es equivalente o mayor a lo observado en las placas de Peyer, sitio donde ocurre la mayor activación y cambio de isotipo de los linfocitos B en todo el cuerpo en respuesta a los antígenos del lumen intestinal (Reboldi & Cyster, 2016).

De manera similar, observamos un patrón notablemente estereotípico en la expresión de dos isotipos de Ig en los linfocitos B tímicos, donde detectamos que una fracción importante expresa IgG2b e IgA. Esto es consistente tanto entre cepas C57BL/6 y Balbc y con datos recientes de literatura (Perera et al., 2013, 2016; Yamano et al., 2015). Sin embargo, aún no se ha establecido cuales señales en el timo determinan el cambio hacia estos isotipos. Además de la interacción con los linfocitos T, se requiere la presencia de citoquinas que promuevan la diferenciación a subtipos específicos de inmunoglobulinas. Tanto para el cambio de clase a la inmunoglobulina IgG2b como IgA, es necesario el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Deenick et al., 1999; McIntyre et al., 1993; Sonoda et al., 1989; Stavnezer & Kang, 2009). El timo contiene altos niveles de TGF- $\beta$ , que es secretado por macrófagos y células dendríticas en respuesta a la fagocitosis de células apoptóticas que son generadas durante la selección negativa y positiva. Por lo tanto, el TGF- $\beta$  producido de manera homeostática en el microambiente del timo podría ser suficiente para promover de forma preferente el cambio de isotipo hacia IgG2b e IgA (Chen & Konkel, 2015; Konkel et al., 2014). Interesantemente, TGF- $\beta$  y los linfocitos B tímicos son

necesarios para la generación de los linfocitos T reguladores tímicos (tTreg) en la médula tímica, mismo lugar donde residen los linfocitos B tímicos (Lu et al., 2015; Walters et al., 2014, Aschenbrenner et al., 2007; Cowan et al., 2013, Perera & Huang, 2015).

Los linfocitos B que se diferencian en células de memoria en órganos linfoides secundarios adquieren de manera heterogénea la expresión de CD73 y/o PD-L2 (Allie et al., 2019; He et al., 2017; Koike et al., 2019; Tomayko et al., 2010). Aquí encontramos que en los linfocitos B tímicos se pueden distinguir tres poblaciones: dos que expresan estas moléculas por separado (CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> y CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>) y una tercera que co-expresa ambas (CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>). Interesantemente encontramos diferencias en la proporción de estas subpoblaciones entre las cepas C57BL/6 y Balbc, ya que en ratones C57BL/6 la principal subpoblación de memoria tiene un fenotipo CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, mientras que en ratones Balbc la mayoría son CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup>. Esto podría atribuirse a diferencias intrínsecas en la respuesta humoral entre ratones C57BL/6 y Balbc, que tienden a desarrollar respuestas tipo Th1 y Th2 respectivamente en respuesta a patógenos (Trunova et al. 2011; Yagi et al. 2006; Ferreira et al. 2018), lo cual posiblemente repercute en el perfil de subtipos de linfocitos B de memoria. Al respecto, un trabajo previo muestra que ratones C57BL/6 posee un tercio de los linfocitos B de memoria IgM<sup>+</sup> que expresa CD73 con respecto a ratones Balbc (D'Souza et al. 2017). A futuro, sería relevante evaluar de manera funcional estas tres subpoblaciones para determinar si, al igual que en órganos linfoides periféricos, la expresión de estos

marcadores es indicativo de distinto potencial de diferenciación hacia células plasmáticas, o si se favorece su interacción con los linfocitos T inmaduros en reacciones similares al centro germinal.

Este trabajo se enfocó en la formación de linfocitos B de memoria tímicos, sin embargo, también existe evidencia de que en el timo se producen células plasmáticas. Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que el timo, tanto en ratones sin inmunización como de muestras humanas de neonatos, contiene células secretoras de IgM, IgG e IgA (Nuñez et al. 2016; Hidalgo et al. 2020). En un trabajo reciente se demostró que el timo contiene células plasmáticas que secretan IgE de forma homeostática (Kwon et al. 2022). Interesantemente, en ese trabajo demuestran que las células plasmáticas se diferencian de forma local por una vía extrafolicular, probablemente por un mecanismo similar a los linfocitos B de memoria.

La interacción entre los linfocitos B y T es indispensable para que ocurra el cambio de isotipo y maduración de la afinidad. Por mucho tiempo se pensaba que ambos procesos ocurrían en la reacción de centro germinal, sin embargo, trabajos recientes han cambiado este paradigma ya que han demostrado que el cambio de clase principalmente ocurre antes del ingreso al centro germinal (Reboldi et al. 2016; Roco et al. 2019). Interesantemente, encontramos que una proporción de los linfocitos B residentes del timo expresan un fenotipo IgD<sup>-</sup>GL-7<sup>+</sup> sugiriendo que podrían tener similitud con el estadio de centro germinal de los



órganos linfoides secundarios. Sin embargo, en estudios previos, el análisis de la secuencia de Ig, tanto de linfocitos B de memoria como células plasmáticas tónicas, muestra que no presentan hipermutación somática (Perera et al. 2016; Kwon et al. 2022) lo cual sugiere que se originan por una vía independiente del centro germinal. Además, en ratones transgénicos  $Cd4^{cre}Bcl6^{fl/fl}$ , incapaces de formar centros germinales, no se ve afectada la formación de células plasmáticas del timo, mientras que en bazo y placas de Peyer disminuyen significativamente (Kwon et al. 2022). Si bien, GL-7 es un marcador expresado por células del centro germinal, su expresión se induce anterior a la formación de los centros germinales y son precursores de células de memoria tempranas que no se originan dentro de los centros germinales (Taylor et al. 2012; Kaji et al. 2012). Por lo tanto, la población  $IgD^{-}GL-7^{+}$  que observamos en el timo podría corresponder a células que se han activado localmente y que son precursoras de células de memoria o células plasmáticas. Todo ello apoya que los linfocitos B de memoria y células plasmáticas se diferencian en el timo por un proceso que se asemejaría a la activación extrafolicular que ocurre en los órganos linfoides en respuesta a un antígeno externo sin la formación de centros germinales.

Dentro de nuestros objetivos, evaluamos en qué medida la formación de linfocitos B de memoria en el timo se ve afectada por la reducción en la formación de memoria en la periferia, usando como aproximación experimental la reducción de antígenos provenientes de la microbiota intestinal. Se usó el modelo de administración de antibióticos perinatal como una aproximación cercana al

modelo de ratones libres de microorganismo (ratones *germ-free*), ya que es un modelo rápido, económico, y una alternativa accesible en comparación con la mantención de ratones *germ-free*, los cuales requieren de instalaciones especializadas que no se encuentran en nuestro país (Kennedy et al. 2018). Al restringir la carga de antígenos de la microbiota intestinal, las poblaciones de linfocitos B de memoria en el timo no se ven mayormente afectadas, sugiriendo que su diferenciación no se encuentra asociada a la activación de los linfocitos B periféricos en respuesta a antígenos. Interesantemente, Kwon y colaboradores mostraron recientemente que el número de células plasmáticas del timo es idéntica entre ratones mantenidos en condiciones convencionales, *germ-free* y *antigen-free* (ratones *germ-free* alimentados con una dieta a base de aminoácidos), mientras que se reducen drásticamente en el bazo y en el ganglio mesentérico. De forma similar, Cukrowska y colaboradores reportaron que el timo de cerdos neonatos posee linfocitos B que secretan anticuerpos IgG e IgA, inclusive cuando son mantenidos en condiciones *germ-free* (Cukrowska et al., 1996). Consistente con lo anterior, se detectan linfocitos B de memoria IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> en el timo de ratones neonatos previo a su diferenciación en los órganos periféricos en un periodo en que el sistema inmune probablemente aún no ha desarrollado respuestas adaptativas a antígenos ambientales. Esto reafirma nuestra hipótesis de que los linfocitos B tímicos realizan cambio de clase en un proceso independiente de la activación de los linfocitos B periféricos. De manera similar, Kwon y colaboradores recientemente reportaron que en ratones Balbc durante la primera semana de vida ya es posible detectar células plasmáticas en

el timo (Kwon et al. 2022). Similarmente, diversos trabajos han reportado que en ratones neonatos la diferenciación de linfocitos T reguladores en el timo se detecta a partir del tercer día de vida y coincide con un aumento en la apoptosis de timocitos y liberación de TGF- $\beta$  en el microambiente tímico (Chen & Konkel 2015; Konkel et al. 2014; Fontenot et al. 2005; Jiang et al. 2006). Lo anterior sugiere que la cinética de producción de TGF- $\beta$  en el timo los primeros días de vida podría estar promoviendo el cambio de isotipo observado en los linfocitos B tímicos durante el periodo neonatal

Al evaluar una posible asociación en el fenotipo de memoria en los linfocitos B y la exposición a antígenos ambientales durante el transcurso de vida del ratón, observamos que en el bazo ocurre una acumulación gradual de poblaciones de memoria. En el timo, por el contrario, observamos que la proporción y número de linfocitos B de memoria declina con la edad. De manera similar a lo que observamos, Cepeda y colaboradores mostró que en el timo de ratones envejecidos ocurre una disminución de los linfocitos B con cambio de clase IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>, y una reducción de la expresión del factor de transcripción *Aire* y del gen *cd40*, sugiriendo que podrían ir perdiendo su funcionalidad como célula presentadora de antígeno en la selección negativa de los timocitos (Cepeda et al. 2018). El timo invariablemente sufre una involución asociada al envejecimiento, y por ende, los linfocitos T en proceso de maduración se hacen progresivamente más escasos (Aspinall & Andrew 2000; Thomas et al. 2020).

Posiblemente, en el contexto del envejecimiento, esto repercute en una menor estimulación de los linfocitos B dada por las interacciones con los linfocitos T inmaduros y, consecuentemente, en su diferenciación a linfocitos B de memoria.

La interacción entre los linfocitos B y timocitos durante la presentación de autoantígenos sería clave para estimular la diferenciación de los linfocitos B de memoria en el timo. En este trabajo analizamos el modelo de ratón OT-II, donde se ve impedida esta interacción dado que la especificidad del TCR está restringida a un péptido de la proteína ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>) –el cual no es un autoantígeno del mismo modelo–. Consistente con resultados previos, observamos que el timo de ratones OT-II presenta una reducción drástica en los linfocitos B de memoria IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup> (Perera et al. 2016). Además, mostramos que en el timo las subpoblaciones CD73<sup>-</sup>PD-L2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>-</sup> y CD73<sup>+</sup>PD-L2<sup>+</sup> también se ven afectadas. Actualmente, estamos evaluando si es posible revertir estos cambios mediante la administración del péptido OVA<sub>323-339</sub>. Interesantemente, encontramos que se ve principalmente afectada la población IgA<sup>+</sup>. El cambio de isotipo hacia IgA es fuertemente dependiente de la citoquina TGF- $\beta$ , cuya producción en el timo es estimulada por la fagocitosis de células apoptóticas (Deenick et al., 1999; McIntyre et al., 1993; Sonoda et al., 1989; Stavnezer & Kang, 2009). Dado que en ratones OT-II no ocurre apoptosis asociada a la selección negativa, actualmente estamos evaluando si esto afecta la expresión de TGF- $\beta$  en el timo.

Lo anterior también está reforzado por otros antecedentes de la literatura que muestran que tanto en ratones deficientes de TCR como en ratones con linfocitos B que carecen de MHC-II, se observa una reducción drástica de los linfocitos B tímicos IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> (Perera et al. 2016). Del mismo modo, en ratones deficientes de CD40 y CD40L, los linfocitos B tímicos son incapaces de realizar cambio de clase de Ig indicando que la señal de ayuda de CD40-CD40L también es imprescindible para que ocurra este fenómeno (Perera et al. 2016; Yamano et al. 2015). La pérdida de interacción entre los linfocitos B y T vía CD40-CD40L también repercute en la adquisición de otras características descritas en los linfocitos B tímicos, tales como la mayor expresión de las moléculas MHC-II, CD80, y del gen *Aire*, corroborando el rol que posee la interacción B-T en la adquisición del fenotipo característicos de los linfocitos B del timo (Perera et al. 2016; Yamano et al. 2015).

Un aspecto importante por considerar es que en la respuesta humoral que se desarrolla en los órganos linfoides secundarios, la interacción B-T y los centros germinales están impulsados por el reconocimiento e internalización de un antígeno específico mediado por el BCR. En el caso de los linfocitos B del timo, donde este proceso estaría impulsado por la presentación de antígenos propios, esto podría ocurrir por: i) la presentación basal de antígenos derivados del propio linfocitos B, independiente de la especificidad del BCR y ii) el reconocimiento e internalización de autoantígenos mediante la expresión de un BCR autorreactivo. Por una parte, el grupo de Yamano ha presentado evidencia

de que el intercambio de señales que ocurre en el timo en la presentación de autoantígenos pareciera ser independiente del BCR (Yamano et al. 2015). Uno de los datos que apoyan esta hipótesis es que la alta expresión de MHC-II y CD80, y de frecuencia de células con cambio de isotipo ocurre incluso en ratones transgénicos  $SW_{HEL}$  cuyos linfocitos B expresan un BCR específicos contra un antígeno no propio (lisozima de huevo) (Yamano et al. 2015). Por otra parte, el grupo de Perera muestra en un modelo de ratón con BCR transgénico, los linfocitos B autoreactivos serían altamente eficientes en inducir la selección negativa (Perera et al. 2013). Sin embargo, resulta complejo conciliar esto con el hecho de que existen mecanismos de tolerancia que aseguran la eliminación de linfocitos B autoreactivos.

En resumen, en este trabajo nosotros demostramos que una población de los linfocitos B presentes en el timo presentan características fenotípicas de memoria por la interacción entre los linfocitos B-T y de manera independiente de la activación de los linfocitos B periféricos. A futuro, sería relevante corroborar si: i)  $TGF-\beta$  realmente es requerido para que los linfocitos B tímicos realicen cambio de isotipo a IgG2b e IgA, ii) que otras señales pueden estar implicadas en este proceso de diferenciación y finalmente, iii) como el fenotipo de memoria puede ser relevante para el rol que poseen los linfocitos B en el timo.

## RESUMEN DE RESULTADOS

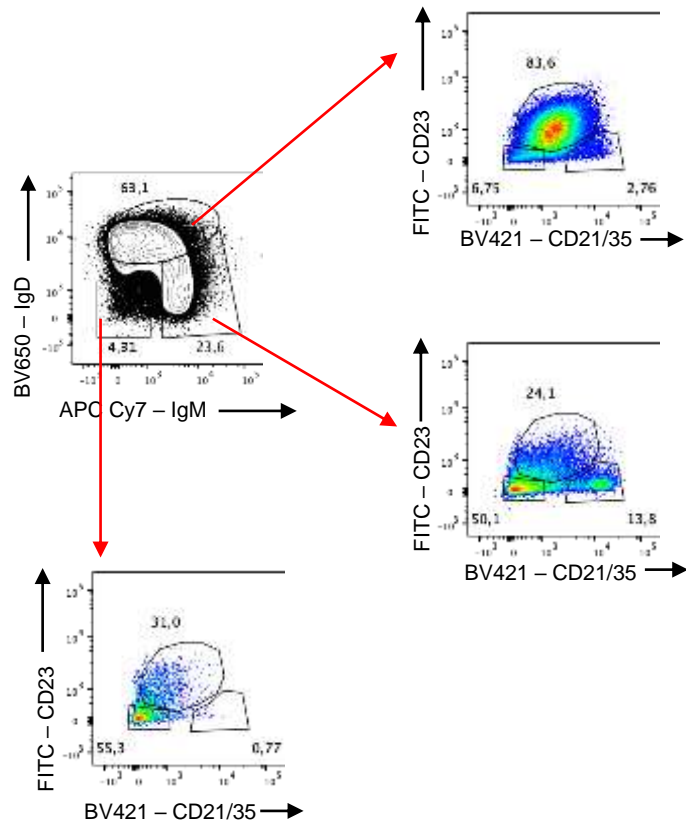
1. De manera homeostática, una fracción significativa de los linfocitos B tímicos presentan cambio de isotipo de inmunoglobulina a IgG2b e IgA, y expresa las moléculas CD73 y PD-L2 asociadas a un fenotipo de memoria periférica.
2. Los linfocitos B que migran al timo realizan cambio de isotipo recapitulando el fenotipo de los linfocitos B residentes en el timo.
3. Los linfocitos B de memoria tímicos no se ven afectados significativamente al reducir la microbiota intestinal y, por consiguiente, la formación de linfocitos B de memoria en la periferia.
4. En el timo, la diferenciación de células de memoria IgG2b<sup>+</sup> e IgA<sup>+</sup> ocurre tempranamente durante la primera semana de vida de los ratones, incluso antes de que este proceso sea detectable en el bazo.
5. Durante el envejecimiento, la proporción de linfocitos B de memoria en el timo disminuye, mientras que en la periferia ocurre una acumulación progresiva durante la vejez.
6. En el modelo OT-II, la pérdida de la interacción entre los linfocitos B y los timocitos durante la selección negativa, repercute negativamente en la diferenciación de linfocitos B de memoria en el timo.

## 7. CONCLUSIÓN

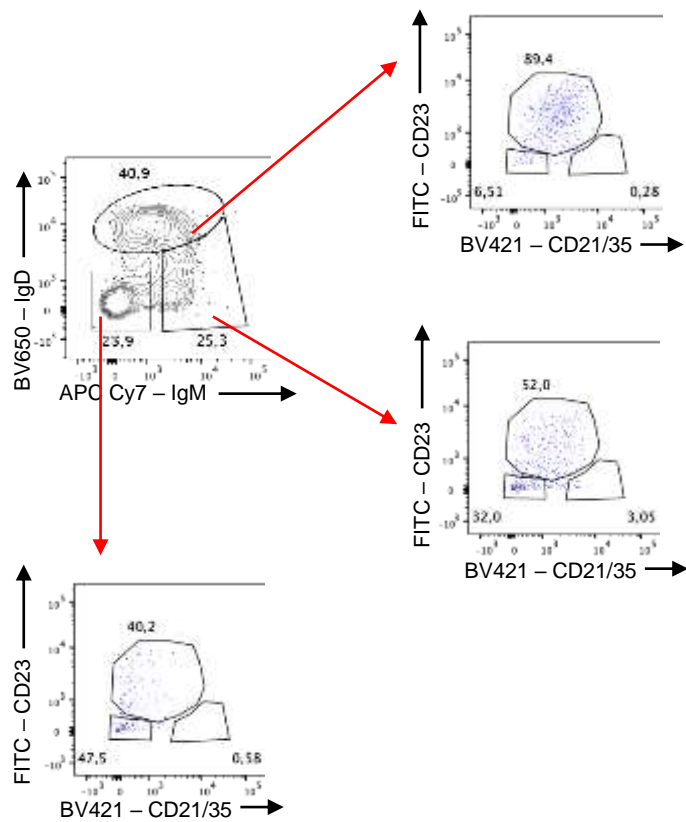
En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que los linfocitos B residentes del timo sufren un proceso de diferenciación atípico hacia células de memoria. En contraste con la diferenciación convencional de linfocitos B de memoria en la periferia que ocurre en respuesta a la activación de los linfocitos B por el reconocimiento de antígenos exógenos, en el timo, este proceso no está influenciado por la exposición a antígenos y ocurre tempranamente desde el periodo neonatal. Interesantemente, la diferenciación de linfocitos B de memoria en el timo es dependiente de la interacción con los timocitos CD4<sup>+</sup> dada por la presentación antigénica. En general, nuestros resultados aportan evidencia de que los linfocitos B tímicos se diferencian localmente en células de memoria a través de la interacción entre los T CD4<sup>+</sup> inmaduros en el contexto de la selección negativa, siendo un proceso independiente de la formación de linfocitos B de memoria en la periferia.



## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura suplementaria 1. Los linfocitos B IgM<sup>+</sup> de bazo son principalmente linfocitos B de zona marginal y CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>.** Gráficos de citometría de flujo representativos de linfocitos B foliculares (CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>), de zona marginal (CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) y dobles negativos (CD21/35<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>) en las poblaciones de linfocitos B de bazo *naive*, cambio de clase e IgM.



**Figura suplementaria 2. Los linfocitos B IgM<sup>+</sup> de timo no presentan linfocitos B de zona marginal y CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>.** Gráficos de citometría de flujo representativos de linfocitos B foliculares (CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>), de zona marginal (CD21/35<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>) y dobles negativos (CD21/35<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>) en las poblaciones de linfocitos B de bazo *naïve*, cambio de clase e IgM.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abul K Abbas, M., Lichtman, A. H., & Shiv Pillai, M. (2021). *Cellular and Molecular Immunology, 10th Edition-South Asia Edition - E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Akashi, K., Richie, L. I., Miyamoto, T., Carr, W. H., & Weissman, I. L. (2000). B lymphopoiesis in the thymus. *Journal of Immunology*, *164*(10), 5221–5226.
- Akirav, E. M., Xu, Y., & Ruddle, N. H. (2011). Resident B cells regulate thymic expression of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of Neuroimmunology*, *235*(1-2), 33–39.
- Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, *20*(4), 229–238.
- Allie, S. R., Bradley, J. E., Mudunuru, U., Schultz, M. D., Graf, B. A., Lund, F. E., & Randall, T. D. (2019). The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nature Immunology*, *20*(1), 97–108.
- Allman, D., & Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, *20*(2), 149–157.
- Aschenbrenner, K., D’Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., Rolink, A., & Klein, L. (2007). Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunology*, *8*(4), 351–358.
- Aspinall, R., & Andrew, D. (2000). Thymic involution in aging. *Journal of Clinical Immunology*, *20*(4), 250–256.
- Barker, K. A., Etesami, N. S., Shenoy, A. T., Arafa, E. I., Lyon de Ana, C., Smith, N. M., Martin, I. M., Goltry, W. N., Barron, A. M., Browning, J. L., Kathuria, H., Belkina, A. C., Guillon, A., Zhong, X., Crossland, N. A., Jones, M. R., Quinton, L. J., & Mizgerd, J. P. (2021). Lung-resident memory B cells protect against bacterial pneumonia. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(11). <https://doi.org/10.1172/JCI141810>

- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Haining, W. N., Jameson, S. C., & Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 532(7600), 512–516.
- Cancro, M. P., & Tomayko, M. M. (2021). Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunological Reviews*, 303(1), 72–82.
- Cebula, Anna, Michal Seweryn, Grzegorz A. Rempala, Simarjot Singh Pabla, Richard A. McIndoe, Timothy L. Denning, Lynn Bry, Piotr Kraj, Pawel Kisielow, and Leszek Ignatowicz. 2013. “Thymus-Derived Regulatory T Cells Contribute to Tolerance to Commensal Microbiota.” *Nature* 497 (7448): 258–62.
- Cepeda, S., Cantu, C., Orozco, S., Xiao, Y., Brown, Z., Semwal, M. K., Venables, T., Anderson, M. S., & Griffith, A. V. (2018). Age-Associated Decline in Thymic B Cell Expression of Aire and Aire-Dependent Self-Antigens. *Cell Reports*, 22(5), 1276–1287.
- Ceredig, R. (2002). The ontogeny of B cells in the thymus of normal, CD3 epsilon knockout (KO), RAG-2 KO and IL-7 transgenic mice. *International Immunology*, 14(1), 87–99.
- Chen, W., & Konkel, J. E. (2015). Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- $\beta$  matters. *European Journal of Immunology*, 45(4), 958–965.
- Cowan, J. E., Parnell, S. M., Nakamura, K., Caamano, J. H., Lane, P. J. L., Jenkinson, E. J., Jenkinson, W. E., & Anderson, G. (2013). The thymic medulla is required for Foxp3+ regulatory but not conventional CD4+ thymocyte development. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(4), 675–681.
- Cukrowska, B., Sinkora, J., Mandel, L., Splíchal, I., Bianchi, A. T., Kovárů, F., & Tlaskalová-Hogenová, H. (1996). Thymic B cells of pig fetuses and germ-free pigs spontaneously produce IgM, IgG and IgA: detection by ELISPOT method. *Immunology*, 87(3), 487–492.
- Cyster, J. G., & Allen, C. D. C. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*, 177(3), 524–540.

- Deenick, E. K., Hasbold, J., & Hodgkin, P. D. (1999). Switching to IgG3, IgG2b, and IgA is division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation. *Journal of Immunology*, *163*(9), 4707–4714.
- Deshmukh, H. S., Liu, Y., Menkiti, O. R., Mei, J., Dai, N., O’Leary, C. E., Oliver, P. M., Kolls, J. K., Weiser, J. N., & Worthen, G. S. (2014). The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nature Medicine*, *20*(5), 524–530.
- Dhenni, R., & Phan, T. G. (2020). The geography of memory B cell reactivation in vaccine-induced immunity and in autoimmune disease relapses. *Immunological Reviews*, *296*(1), 62–86.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., & Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature Immunology*, *10*(12), 1292–1299.
- D’Souza, L., Gupta, S. L., Bal, V., Rath, S., & George, A. (2017). CD73 expression identifies a subset of IgM antigen-experienced cells with memory attributes that is T cell and CD40 signalling dependent. *Immunology*, *152*(4), 602–612.
- Ferreira, B. L., Ferreira, É. R., de Brito, M. V., Salu, B. R., Oliva, M. L. V., Mortara, R. A., & Orikaza, C. M. (2018). BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 553.
- Ferrero, I., Anjuère, F., Martín, P., Martínez del Hoyo, G., Fraga, M. L., Wright, N., Varona, R., Márquez, G., & Ardavín, C. (1999). Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection. *European Journal of Immunology*, *29*(5), 1598–1609.
- Fontenot, J. D., Dooley, J. L., Farr, A. G., & Rudensky, A. Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(7), 901–906.
- Frommer, F., Heinen, T. J. A. J., Wunderlich, F. T., Yogev, N., Buch, T., Roers, A., Bettelli, E., Müller, W., Anderton, S. M., & Waisman, A. (2008). Tolerance without

clonal expansion: self-antigen-expressing B cells program self-reactive T cells for future deletion. *Journal of Immunology*, 181(8), 5748–5759.

Frommer, F., & Waisman, A. (2010). B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells. *PLoS One*, 5(10), e15372.

Fujihara, C., Williams, J. A., Watanabe, M., Jeon, H., Sharrow, S. O., & Hodes, R. J. (2014). T cell-B cell thymic cross-talk: maintenance and function of thymic B cells requires cognate CD40-CD40 ligand interaction. *Journal of Immunology*, 193(11), 5534–5544.

Gardner, J. M., Fletcher, A. L., Anderson, M. S., & Turley, S. J. (2009). AIRE in the thymus and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 21(6), 582–589.

Gonzalez-Perez, G., Hicks, A. L., Tekieli, T. M., Radens, C. M., Williams, B. L., & Lamousé-Smith, E. S. N. (2016). Maternal Antibiotic Treatment Impacts Development of the Neonatal Intestinal Microbiome and Antiviral Immunity. *Journal of Immunology*, 196(9), 3768–3779.

He, J.-S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S. P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., Chen, J., Poidinger, M., Zolezzi, F., Lafaille, J. J., & Curotto de Lafaille, M. A. (2017). IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nature Communications*, 8(1), 641.

Hidalgo, Y., Núñez, S., Fuenzalida, M. J., Flores-Santibáñez, F., Sáez, P. J., Dorner, J., Lennon-Dumenil, A.-M., Martínez, V., Zorn, E., Roseblatt, M., Sauma, D., & Bono, M. R. (2020). Thymic B Cells Promote Germinal Center-Like Structures and the Expansion of Follicular Helper T Cells in Lupus-Prone Mice. *Frontiers in Immunology*, 11, 696.

Inaba, M., Inaba, K., Hosono, M., Kumamoto, T., Ishida, T., Muramatsu, S., Masuda, T., & Ikehara, S. (1991). Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(3), 549–559.

Isaacson, P. G., Norton, A. J., & Addis, B. J. (1987). The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *The Lancet*, 2(8574), 1488–1491.

- Jiang, Q., Su, H., Knudsen, G., Helms, W., & Su, L. (2006). Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunology*, 7, 6.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., & Takemori, T. (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 2079–2097.
- Kennedy, E. A., King, K. Y., & Baldrige, M. T. (2018). Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Frontiers in Physiology*, 9, 1534.
- Kleindienst, P., Chretien, I., Winkler, T., & Brocker, T. (2000). Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo. *Blood*, 95(8), 2610–2616.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews. Immunology*, 14(6), 377–391.
- Koike, T., Harada, K., Horiuchi, S., & Kitamura, D. (2019). The quantity of CD40 signaling determines the differentiation of B cells into functionally distinct memory cell subsets. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.44245>
- Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R., & Chen, W. (2014). Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), E465–E473.
- Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nature Reviews. Immunology*, 15(3), 149–159.
- Kwon, D.-I., Park, E. S., Kim, M., Choi, Y. H., Lee, M.-S., Joo, S.-H., Kang, Y.-W., Lee, M., Jo, S.-B., Lee, S.-W., Kim, J. K., & Lee, Y. J. (2022). Homeostatic serum IgE is secreted by plasma cells in the thymus and enhances mast cell survival. *Nature Communications*, 13(1), 1418.

- Lamousé-Smith, E. S., Tzeng, A., & Starnbach, M. N. (2011). The intestinal flora is required to support antibody responses to systemic immunization in infant and germ free mice. *PloS One*, 6(11), e27662.
- Liao, W., Hua, Z., Liu, C., Lin, L., Chen, R., & Hou, B. (2017). Characterization of T-Dependent and T-Independent B Cell Responses to a Virus-like Particle. *Journal of Immunology*, 198(10), 3846–3856.
- Li, F., Hao, X., Chen, Y., Bai, L., Gao, X., Lian, Z., Wei, H., Sun, R., & Tian, Z. (2017). The microbiota maintain homeostasis of liver-resident  $\gamma\delta$ T-17 cells in a lipid antigen/CD1d-dependent manner. *Nature Communications*, 7, 13839.
- Lindner, C., Thomsen, I., Wahl, B., Ugur, M., Sethi, M. K., Friedrichsen, M., Smoczek, A., Ott, S., Baumann, U., Suerbaum, S., Schreiber, S., Bleich, A., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., Hazanov, H., Mehr, R., Boysen, P., Rosenstiel, P., & Pabst, O. (2015). Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nature Immunology*, 16(8), 880–888.
- Lu, F.-T., Yang, W., Wang, Y.-H., Ma, H.-D., Tang, W., Yang, J.-B., Li, L., Ansari, A. A., & Lian, Z.-X. (2015). Thymic B cells promote thymus-derived regulatory T cell development and proliferation. *Journal of Autoimmunity*, 61, 62–72.
- MacLean, A. J., Richmond, N., Koneva, L., Attar, M., Medina, C. A. P., Thornton, E. E., Gomes, A. C., El-Turabi, A., Bachmann, M. F., Rijal, P., Tan, T. K., Townsend, A., Sansom, S. N., Bannard, O., & Arnon, T. I. (2022). Secondary influenza challenge triggers resident memory B cell migration and rapid relocation to boost antibody secretion at infected sites. *Immunity*, 55(4), 718–733.e8.
- Martin, F., & Kearney, J. F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nature Reviews. Immunology*, 2(5), 323–335.
- Mazda, O., Watanabe, Y., Gytoku, J., & Katsura, Y. (1991). Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls-reactive T cells in the thymus. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(3), 539–547.
- McHeyzer-Williams, L. J., & McHeyzer-Williams, M. G. (2005). ANTIGEN-SPECIFIC MEMORY B CELL DEVELOPMENT. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 23,



- McHeyzer-Williams, M. G., & Ahmed, R. (1999). B cell memory and the long-lived plasma cell. *Current Opinion in Immunology*, 11(2), 172–179.
- McIntyre, T. M., Klinman, D. R., Rothman, P., Lugo, M., Dasch, J. R., Mond, J. J., & Snapper, C. M. (1993). Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(4), 1031–1037.
- Miyama-Inaba, M., Kuma, S., Inaba, K., Ogata, H., Iwai, H., Yasumizu, R., Muramatsu, S., Steinman, R. M., & Ikehara, S. (1988). Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(2), 811–816.
- Moran, I., Nguyen, A., Khoo, W. H., Butt, D., Bourne, K., Young, C., Hermes, J. R., Biro, M., Gracie, G., Ma, C. S., Munier, C. M. L., Luciani, F., Zaunders, J., Parker, A., Kelleher, A. D., Tangye, S. G., Croucher, P. I., Brink, R., Read, M. N., & Phan, T. G. (2018). Memory B cells are reactivated in subcapsular proliferative foci of lymph nodes. *Nature Communications*, 9(1), 3372.
- Nanjundappa, Roopa Hebbandi, Channakeshava Sokke Umeshappa, and Markus B. Geuking. 2022. “The Impact of the Gut Microbiota on T Cell Ontogeny in the Thymus.” *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04252-y>.
- Nuñez, S., Moore, C., Gao, B., Rogers, K., Hidalgo, Y., Del Nido, P. J., Restaino, S., Naka, Y., Bhagat, G., Madsen, J. C., Bono, M. R., & Zorn, E. (2016). The human thymus perivascular space is a functional niche for viral-specific plasma cells. *Science Immunology*, 1(6). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah4447>
- Oh, J. E., Song, E., Moriyama, M., Wong, P., Zhang, S., Jiang, R., Strohmeier, S., Kleinstein, S. H., Krammer, F., & Iwasaki, A. (2021). Intranasal priming induces local lung-resident B cell populations that secrete protective mucosal antiviral IgA. *Science Immunology*, 6(66), eabj5129.
- Onodera, T., Takahashi, Y., Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., & Kobayashi, K. (2012). Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(7), 2485–2490.

Palm, A.-K. E., & Henry, C. (2019). Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. *Frontiers in Immunology*, 10, 1787.

Pape, K. A., Taylor, J. J., Maul, R. W., Gearhart, P. J., & Jenkins, M. K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science*, 331(6021), 1203–1207.

Pellegrini, A., Guiñazú, N., Aoki, M. P., Calero, I. C., Carrera-Silva, E. A., Girones, N., Fresno, M., & Gea, S. (2007). Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *International Immunology*, 19(12), 1395–1402.

Perera, J., & Huang, H. (2015). The development and function of thymic B cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(14), 2657–2663.

Perera, J., Meng, L., Meng, F., & Huang, H. (2013). Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 110, Issue 42, pp. 17011–17016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1313001110>

Perera, J., Zheng, Z., Li, S., Gudjonson, H., Kalinina, O., Benichou, J. I. C., Block, K. E., Louzoun, Y., Yin, D., Chong, A. S., Dinner, A. R., Weigert, M., & Huang, H. (2016). Self-Antigen-Driven Thymic B Cell Class Switching Promotes T Cell Central Tolerance. *Cell Reports*, 17(2), 387–398.

Punnonen, J., & de Vries, J. E. (1993). Characterization of a novel CD2+ human thymic B cell subset. *Journal of Immunology*, 151(1), 100–110.

Reboldi, A., Arnon, T. I., Rodda, L. B., Atakilit, A., Sheppard, D., & Cyster, J. G. (2016). IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science*, 352(6287), aaf4822.

Reboldi, A., & Cyster, J. G. (2016). Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunological Reviews*, 271(1), 230–245.

- Roco, J. A., Mesin, L., Binder, S. C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P. F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P. A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C. R., Schiepers, A., Corcoran, L. M., Toellner, K.-M., Polo, J. M., Meyer-Hermann, M., Vitorica, G. D., & Vinuesa, C. G. (2019). Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*, *51*(2), 337–350.e7.
- Rudensky, A. Y., Mazel, S. M., & Yurin, V. L. (1990). Presentation of endogenous immunoglobulin determinant to immunoglobulin-recognizing T cell clones by the thymic cells. *European Journal of Immunology*, *20*(10), 2235–2239.
- Scholz, J. L., Diaz, A., Riley, R. L., Cancro, M. P., & Frasca, D. (2013). A comparative review of aging and B cell function in mice and humans. *Current Opinion in Immunology*, *25*(4), 504–510.
- Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Ishii, T., Sugimoto, M., Araki, S., Tominaga, A., Yamaguchi, N., & Takatsu, K. (1989). Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *The Journal of Experimental Medicine*, *170*(4), 1415–1420.
- Spencer, J., Choy, M., Hussell, T., Papadaki, L., Kington, J. P., & Isaacson, P. G. (1992). Properties of human thymic B cells. *Immunology*, *75*(4), 596–600.
- Stavnezer, J., & Kang, J. (2009). The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch [Review of *The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch*]. *Journal of Immunology*, *182*(1), 5–7.
- Szondy, Z., Garabuczi, É., Tóth, K., Kiss, B., & Köröskényi, K. (2012). Thymocyte death by neglect: contribution of engulfing macrophages. *European Journal of Immunology*, *42*(7), 1662–1667.
- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., & Rajewsky, K. (2014). Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *European Journal of Immunology*, *44*(5), 1258–1264.
- Tangye, S. G., & Tarlinton, D. M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European Journal of Immunology*, *39*(8), 2065–2075.

- Tan, H.-X., Juno, J. A., Esterbauer, R., Kelly, H. G., Wragg, K. M., Konstandopoulos, P., Alcantara, S., Alvarado, C., Jones, R., Starkey, G., Wang, B. Z., Yoshino, O., Tiang, T., Grayson, M. L., Opdam, H., D'Costa, R., Vago, A., Austin Liver Transplant Perfusionist Group, Mackay, L. K., ... Wheatley, A. K. (2022). Lung-resident memory B cells established after pulmonary influenza infection display distinct transcriptional and phenotypic profiles. *Science Immunology*, 7(67), eabf5314.
- Taylor, J. J., Pape, K. A., & Jenkins, M. K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 597–606.
- Thomas, R., Wang, W., & Su, D.-M. (2020). Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immunity & Ageing: I & A*, 17, 2.
- Tomayko, M. M., Steinel, N. C., Anderson, S. M., & Shlomchik, M. J. (2010). Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *Journal of Immunology*, 185(12), 7146–7150.
- Trunova, G. V., Makarova, O. V., Diatroptov, M. E., Bogdanova, I. M., Mikchailova, L. P., & Abdulaeva, S. O. (2011). Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57BL/6 mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 151(1), 99–102.
- Vajdy, M., & Lycke, N. (1993). Stimulation of antigen-specific T- and B-cell memory in local as well as systemic lymphoid tissues following oral immunization with cholera toxin adjuvant. *Immunology*, 80(2), 197–203.
- Walters, S. N., Webster, K. E., Daley, S., & Grey, S. T. (2014). A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 193(1), 170–176.
- Xing, C., Ma, N., Xiao, H., Wang, X., Zheng, M., Han, G., Chen, G., Hou, C., Shen, B., Li, Y., & Wang, R. (2015). Critical role for thymic CD19+CD5+CD1dhiIL-10+ regulatory B cells in immune homeostasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(3), 547–556.
- Yagi, J., Arimura, Y., Takatori, H., Nakajima, H., Iwamoto, I., & Uchiyama, T. (2006). Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity

for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells. *International Immunology*, 18(12), 1681–1690.

Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Steinert, M., Koser, S., Pinto, S., Gerdes, N., Lutgens, E., Ishimaru, N., Busslinger, M., Brors, B., Kyewski, B., & Klein, L. (2015). Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity*, 42(6), 1048–1061.

Yoshida, T., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S., & Hoyer, B. F. (2010). Memory B and memory plasma cells. In *Immunological Reviews* (Vol. 237, Issue 1, pp. 117–139). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2010.00938.x>

Zegarra-Ruiz, Daniel F., Dasom V. Kim, Kendra Norwood, Myunghoo Kim, Wan-Jung H. Wu, Fatima B. Saldana-Morales, Andrea A. Hill, et al. 2021. “Thymic Development of Gut-Microbiota-Specific T Cells.” *Nature* 594 (7863): 413–17.

Zuccarino-Catania, G. V., Sadanand, S., Weisel, F. J., Tomayko, M. M., Meng, H., Kleinstein, S. H., Good-Jacobson, K. L., & Shlomchik, M. J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nature Immunology*, 15(7), 631–637.

Zúñiga-Pflücker, J. C. (2004). T-cell development made simple. *Nature Reviews Immunology*, 4(1), 67–72.

## PUBLICACIONES

1) Review publicado en Frontiers in Immunology (2021)

**The multifaceted roles of B cells in the thymus: from immune tolerance to autoimmunity**

Justine Castañeda<sup>1</sup>, Yessia Hidalgo<sup>2</sup>, Daniela Sauma<sup>1</sup>, Mario Roseblatt<sup>1,3,4</sup>,  
María Rosa Bono<sup>1\*</sup>, Sarah Núñez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Cell for cells-Consorcio Regenero, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián, Santiago Chile.

<sup>4</sup>Fundación Ciencia y Vida, Santiago, Chile.

2) Manuscrito en preparación

**Thymus-resident B cells undergo local homeostatic differentiation into memory cells starting from early life**

Justine Castañeda<sup>1</sup>, Lillian Poblete<sup>1</sup>, Mariana Roseblatt<sup>2</sup>, Daniela Sauma<sup>1,2</sup>,  
Mario Roseblatt<sup>1,2,3</sup>, María Rosa Bono<sup>1,2</sup>, Sarah Núñez<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Centro Ciencia y Vida, Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián, Santiago Chile.