



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN mTOR EN LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

Laura Mañogil González

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2020-21

PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN mTOR EN LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

Laura Mañogil González

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Islas Baleares

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

Inmunodeficiencia Variable Común, linfocito B, linfocito B virgen, linfocito B de memoria, citometría de flujo, mTOR, pS6, estandarización.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Vanesa Cunill Monjo

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESUMEN

Antecedentes: La Inmunodeficiencia Variable Común (IVC) consiste en un conjunto heterogéneo de trastornos caracterizados por un déficit primario de anticuerpos séricos de tipo IgG junto con IgM y/o IgA y pobre respuesta a la vacunación. Los pacientes presentan infecciones bacterianas recurrentes y en algunos casos, procesos autoinmunes, linfoproliferativos y/o gastrointestinales, entre otros. Entre las alteraciones descritas, el hallazgo más consistente es un defecto a nivel de diferenciación de los linfocitos B a células de memoria o plasmáticas productoras de anticuerpos. La vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR/S6 es esencial para el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de diferentes poblaciones del sistema inmunitario, por lo que alteraciones en la misma podrían comprometer la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B de pacientes con IVC.

Métodos: Se ha llevado a cabo la estandarización de un ensayo por citometría de flujo para evaluar la vía de señalización mTOR mediante la detección de los niveles de fosforilación de la proteína S6. Una vez estandarizado, a partir de muestras de sangre periférica, se han estudiado los niveles, basales y tras estimulación, de fosforilación de la proteína S6 en linfocitos B vírgenes y de memoria de controles sanos y pacientes con IVC.

Resultados: Describimos, en linfocitos B vírgenes de controles sanos, un incremento de los niveles de fosforilación de S6 tras estimulación con anti-BCR. Los pacientes con IVC estudiados parecen presentar una alteración de los niveles de fosforilación de S6 tras estimulación con anti-BCR e IL-21. Hay que considerar que se trata de un estudio preliminar con un tamaño de muestra limitado.

Conclusiones: Se ha logrado la estandarización de un ensayo por citometría de flujo para el estudio de la fosforilación de la proteína S6 en respuesta a diferentes estímulos. Este ensayo tiene gran aplicabilidad en el campo de las inmunodeficiencias primarias.

Palabras clave: Inmunodeficiencia Variable Común, linfocito B, linfocito B virgen, linfocito B de memoria, citometría de flujo, mTOR, pS6, estandarización.

SUMMARY

Background: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disorder characterized by reduced IgG serum levels with decreased IgM and/or IgA and poor response to vaccination. Patients suffer from recurrent respiratory infections, accompanied by autoimmunity, lymphoproliferative and/or gastrointestinal processes. The most consistent finding is a defect at the level of B lymphocyte differentiation to memory or plasma cells. The (PI3K)/AKT/mTOR/S6 signaling pathway is essential for the growth, proliferation, differentiation and survival of different immune system populations; therefore, alterations in this pathway could compromise the survival and differentiation of B lymphocytes in patients with CVID.

Methods: We have standardized a flow cytometry assay to evaluate the mTOR signaling pathway by detecting the phosphorylation levels of the S6 protein. Once standardized, the basal and post-stimulation levels of S6 protein phosphorylation in naive and memory B lymphocytes from healthy controls and CVID patients were studied from peripheral blood samples.

Results: We describe, in naive B cells from healthy controls, an increase in S6 phosphorylation levels after stimulation with anti-BCR. The CVID patients studied seem to show an alteration of S6 phosphorylation levels after stimulation with anti-BCR and IL-21. It should be considered that this is a preliminary study with a limited sample size.

Conclusions: Standardization of a flow cytometry assay for the study of S6 protein phosphorylation in response to different stimuli has been achieved. This assay has great applicability in the field of primary immunodeficiencies.

Key words: Common Variable Immunodeficiency, B lymphocyte, naive B lymphocyte, memory B lymphocyte, flow cytometry, mTOR, pS6, standardization.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. ABREVIACIONES	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. El sistema inmunitario	2
2.2. Los linfocitos B.....	2
2.3. Inmunodeficiencia Variable Común.....	3
2.4. Citometría de flujo.....	4
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Sujetos del estudio.....	8
4.2. Estandarización del protocolo	8
4.2.1. Aislamiento de PBMC	9
4.2.2. Contaje, ajuste y cultivo celular	9
4.2.3. Marcaje de las moléculas de interés	10
4.2.4. Estimulación.....	10
4.2.5. Fijación, permeabilización y marcaje intracelular.....	11
4.2.6. Ajustes y configuración del protocolo por citometría de flujo	11
4.3. Estudio de pacientes y controles.....	12
4.4. Análisis de los resultados.....	12
5. RESULTADOS	13
5.1. Optimización del protocolo	13
5.1.1. Elección de los fluorocromos.....	13
5.1.2. Optimización de la duración del protocolo.....	15
5.1.3. Optimización del protocolo de fijación y permeabilización	16
5.1.4. Comprobación.....	17
5.2. Resultados de la fosforilación de S6 en controles sanos.....	18
5.3. Resultados de la fosforilación de S6 en pacientes con IVC.....	18
5.4. Resultados comparativos de la fosforilación de S6 entre controles y pacientes	19
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	22
7.1. Limitaciones	22
7.2. Impacto y perspectivas futuras.....	22
8. BIBLIOGRAFÍA	23

1. ABREVIACIONES

Ag	Antígeno
BCR	Del inglés, <i>B cell receptor</i>
CEIC	Comité de Ética en Investigación Clínica
ESID	Sociedad Europea de Inmunodeficiencias
FSC	Del inglés, <i>forward scatter</i>
HUSE	Hospital Universitario son Espases
IdISBa	Instituto de Investigación Sanitaria de las Islas Baleares
Ig	Inmunoglobulina
IL-21	Interleucina 21
IVC	Inmunodeficiencia Variable Común
KLH	Del inglés, <i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LRBA	Del inglés, <i>lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein</i>
mTOR	Del inglés, <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
pS6	Proteína S6 fosforilada
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
SSC	Del inglés, <i>side scatter</i>
Th	Linfocito T helper

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El sistema inmunitario

El sistema inmunitario mediante la complementación y coordinación de la inmunidad innata y adaptativa ejerce un papel protector del organismo frente a agentes externos (virus, hongos y bacterias), así como internos derivados de los procesos de tumoración.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y se define como una respuesta evolutivamente más primitiva caracterizada por su rapidez e inespecificidad en el proceso de reconocimiento de antígenos (Ag). Está formada por barreras físicas, como la piel o las mucosas; barreras celulares que incluyen macrófagos, neutrófilos y células dendríticas; y finalmente, barreras químicas donde destaca el sistema del complemento.

Por su parte, la respuesta adaptativa mediada por los linfocitos B y T, se basa en respuestas más complejas que se dan tras el reconocimiento específico de los antígenos, hecho que desencadena una respuesta clonal capaz de generar memoria inmunológica. Ésta permite a los organismos responder con mayor velocidad e intensidad frente a exposiciones posteriores a dichos agentes lesivos. Para que se puedan activar estos tipos celulares, tras la activación de la respuesta innata, se requieren señales dependientes del antígeno y señales coestimuladoras.

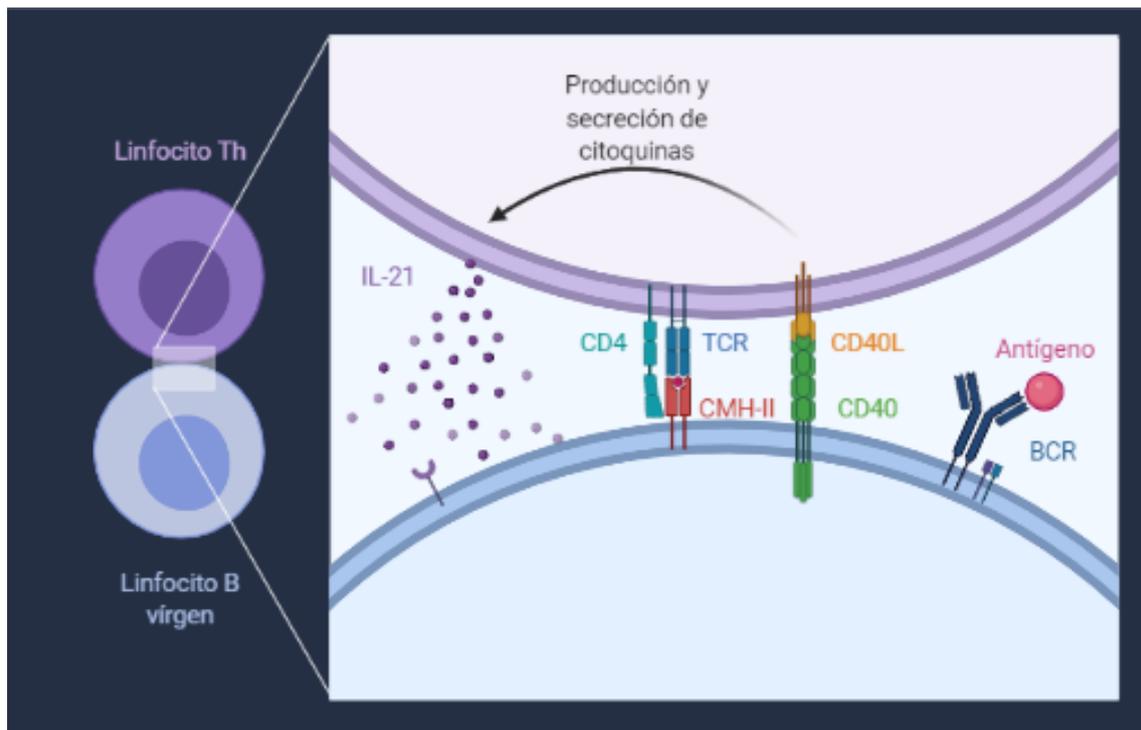
2.2. Los linfocitos B

Los linfocitos B son los principales efectores de la respuesta inmunitaria adaptativa humoral, basada en la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) esenciales en el reconocimiento nativo del antígeno. Estas glucoproteínas se encuentran solubles en plasma o formando parte del receptor de superficie del linfocito B, conocido como BCR (del inglés *B cell receptor*).

Este tipo celular se genera en la médula ósea roja a partir de células madre pluripotenciales, de donde salen a la circulación en forma de linfocitos B vírgenes, los cuales todavía no han entrado en contacto con el antígeno. Éstos migran a los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, donde se almacenan a la espera de la llegada del antígeno. Una vez que sucede el reconocimiento entre el BCR y un antígeno específico, los linfocitos B se estimulan sucediéndose los procesos de selección y expansión clonal; así como maduración de la afinidad y cambio de clase de Ig (permite la producción y expresión de otras clases de Ig; IgA, IgG e IgE). Como resultado, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos o en células B de memoria.

Para la correcta diferenciación se requiere además la colaboración de linfocitos T helper (Th). El reconocimiento del antígeno por el linfocito B promueve la interacción con el linfocito Th a través de la unión del CD40 en la superficie del linfocito B con el CD40L inducido en el linfocito Th. Esta interacción (CD40-CD40L) lleva al linfocito Th a producir y secretar citoquinas, entre ellas IL-21 (interleucina 21), esenciales en los procesos de proliferación y diferenciación del linfocito B (Figura 1).

Figura 1. Colaboración entre el linfocito B vírgen y Th.



Esquema de la colaboración entre los linfocitos B vírgenes y los linfocitos Th para la correcta diferenciación del linfocito B.

Dicha ilustración ha sido creada con BioRender.com

2.3. Inmunodeficiencia Variable Común

La Inmunodeficiencia Variable Común (IVC) es la inmunodeficiencia primaria sintomática más frecuente, con una prevalencia estimada entre 1/10.000 y 1/50.000. Los pacientes se caracterizan por presentar una deficiencia de anticuerpos séricos de tipo IgG junto con bajos niveles de IgM y/o IgA (hipogammaglobulinemia). Esta hipogammaglobulinemia conlleva infecciones bacterianas recurrentes, principalmente a nivel de tracto respiratorio, causadas en la mayoría de los casos por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Adicionalmente, los afectados pueden manifestar procesos autoinmunes, linfoproliferativos y/o gastrointestinales entre otros trastornos¹⁻⁴.

Seguendo los criterios establecidos por la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID)⁵ se establece como probable la IVC cuando los pacientes, a partir de los 2 años, presentan una reducción de IgG además de IgM y/o IgA séricas, junto con mala respuesta a vacunación. Se trata de un diagnóstico de exclusión puesto que deben haberse descartado otras causas de hipogammaglobulinemia. Dado que esta es la principal alteración, el tratamiento se basa en la administración de inmunoglobulinas séricas para mantener unos niveles de IgG normales con el fin de evitar las infecciones recurrentes³. En los casos más graves se recurre al trasplante de células madre hematopoyéticas⁴.

Si bien, la causa de la IVC sigue considerándose desconocida, ya que solo se han identificado causas de tipo monogénico en un 20 % de los pacientes⁴. Se han descrito alteraciones en el sistema inmunitario adaptativo, especialmente en la población linfocitaria B. En relación a este tipo celular, la mayoría de afectados con IVC presentan niveles normales de células B vírgenes, con alteración en las poblaciones de memoria y plasmáticas productoras de anticuerpos, lo que denota que existen alteraciones a nivel de diferenciación del linfocito B en los centros germinales.⁶

Para la correcta diferenciación, los linfocitos B deben integrar las señales recibidas del microambiente y activar programas transcripcionales que determinarán su supervivencia, proliferación y funciones. En este proceso está implicada la proteína mTOR (del inglés *mammalian Target of Rapamycin*), que en condiciones favorables desencadena rutas biosintéticas esenciales para el crecimiento y proliferación, principalmente mediante la fosforilación de S6K y 4E-BP1⁷. De hecho, la deficiencia de LRBA (del inglés, *lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein*), causante de fenotipo clínico de IVC y autoinmunidad, pertenece al grupo de inmunodeficiencias denominadas "TORopatías inmunes" causadas por defectos en componentes de la vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR/S6⁸.

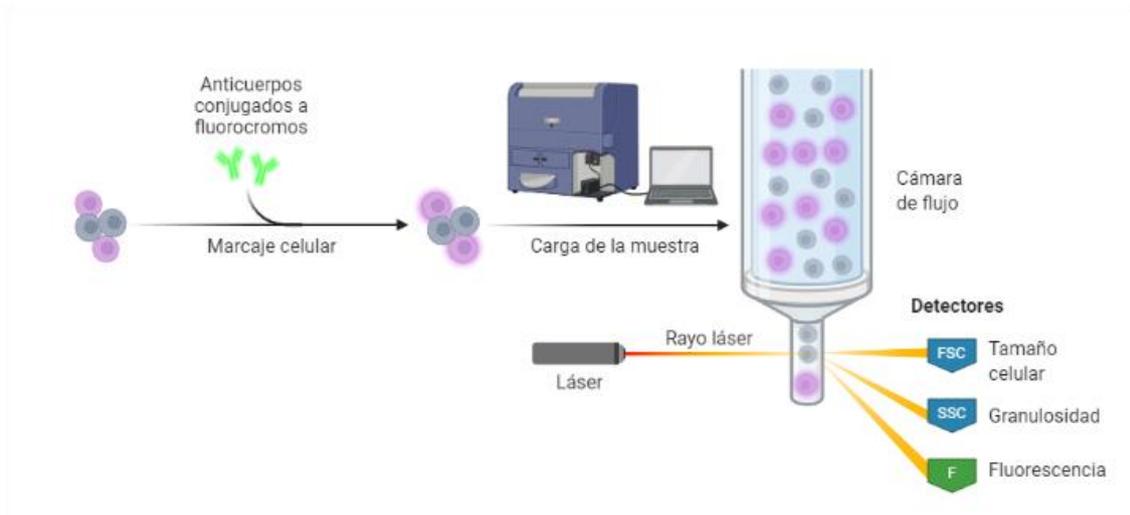
2.4. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis simultáneo de múltiples parámetros en las poblaciones celulares de estudio. Se fundamenta en hacer incidir un haz de láser sobre una suspensión de células alineadas. El impacto de la luz con la célula produce una alteración en la trayectoria del haz que permite la identificación del tamaño (absorción de luz) y la complejidad celular (dispersión de luz). Adicionalmente, se puede detectar la fluorescencia emitida por moléculas fluorescentes, con afinidad por las proteínas de interés, que han sido excitados por el láser (Figura 2).

El citómetro de flujo está compuesto por una serie de componentes que se pueden clasificar en tres sistemas⁹:

- Sistema de fluidos. Es el responsable de transportar las partículas (generalmente células) a la cámara de flujo y generar una corriente líquida laminar permitiendo que pasen alineadas, de una en una, por delante de un haz de láser.
- Sistema óptico. Se compone de uno o varios láseres y de un sistema de lentes, espejos dicróicos y filtros que conducen las señales producidas hacia los detectores:
 - FSC (del inglés, *forward scatter*): Detecta la luz dispersada frontalmente al láser para determinar el tamaño celular
 - SSC (del inglés, *side scatter*): Detecta la luz dispersada lateralmente, con un ángulo de 90 °, para determinar la complejidad celular.
 - Detectores de fluorescencia: Perciben la emisión producida por los diferentes fluorocromos. Gracias a un sistema de filtros ópticos y espejos, los detectores reciben únicamente determinados rangos de longitudes de onda pudiendo discriminar entre diferentes fluorocromos en una misma muestra.
- Sistema electrónico. Su función se basa en el uso de fotodiodos y fotomultiplicadores que convierten las señales luminosas en señales eléctricas que son digitalizadas y amplificadas, permitiendo su interpretación y análisis por un sistema informático.

Figura 2. Esquema general del funcionamiento de un citómetro de flujo.



En la imagen se ilustra el esquema simplificado del funcionamiento del citómetro de flujo y el procesamiento previo de la muestra. En primer lugar, se deben marcar moléculas específicas de la población de estudio con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos. Una vez marcadas las proteínas de interés, las muestras se cargan en el citómetro donde gracias al sistema de fluidos serán conducidas a la cámara de flujo donde son incididas con un haz de láser de modo que las señales que se emiten llegan a detectores que medirán el tamaño, granulosidad celular y fluorescencia asociada.

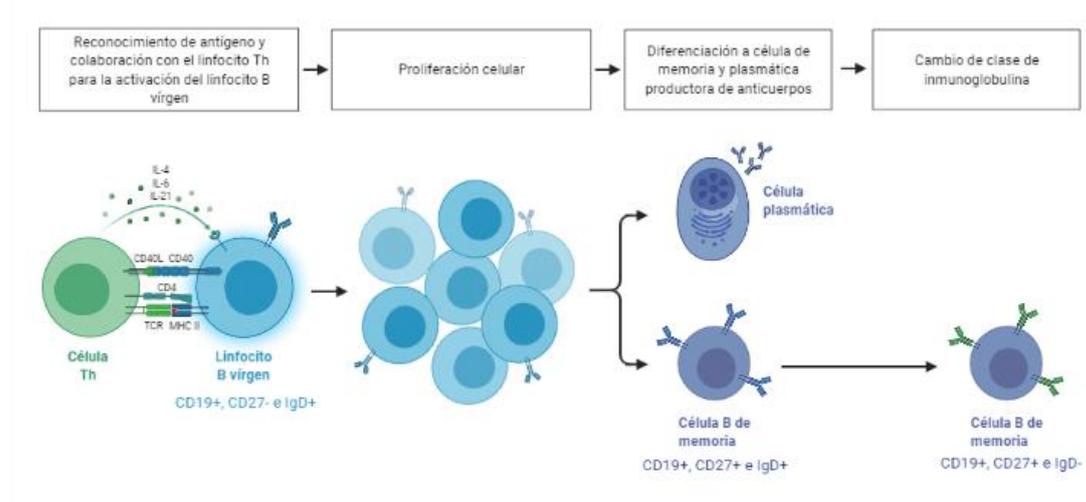
Dicha ilustración ha sido creada con BioRender.com

Al tratarse de una técnica que permite el estudio de células en suspensión, destaca su utilidad en campos como la hematología e inmunología. Además, la capacidad de poder utilizar distintos fluorocromos conjugados a anticuerpos monoclonales específicos permite estudiar de forma simultánea múltiples subpoblaciones linfocitarias. Estas pueden identificarse a partir de determinados patrones de antígenos de superficie característicos.

Por este motivo, el presente estudio se centra en el análisis mediante esta técnica de las principales subpoblaciones de linfocitos B (CD19⁺), entre las que se encuentran (Figura 3):

- Los linfocitos B vírgenes, que presentan el siguiente fenotipo: CD19⁺, CD27⁻ e IgD⁺.
- Los B de memoria, CD19⁺ y CD27⁺, los cuales, se pueden diferenciar en:
 - Los que no han realizado el cambio de clase: CD19⁺, CD27⁺ e IgD⁺.
 - Los que ya han superado el proceso de cambio de clase: CD19⁺, CD27⁺ e IgD⁻.

Figura 3. Subpoblaciones del linfocito B.



Subpoblaciones del linfocito B con sus correspondientes fenotipos de moléculas de superficie.

Dicha ilustración ha sido creada con BioRender.com

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos del grupo en el que se enmarca el presente trabajo han demostrado que los linfocitos B de memoria de los pacientes con IVC presentan defectos de supervivencia y una mayor tendencia a la apoptosis *in vitro*¹⁰.

Hipótesis:

Alteraciones en la vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR/S6 podrían comprometer la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B de pacientes con IVC⁸.

Objetivos:

1. Estandarización de un protocolo por citometría de flujo para el análisis de la actividad de la vía mTOR en linfocitos B mediante la detección del nivel de fosforilación de la proteína S6 (pS6).
2. Evaluar y comparar, en linfocitos B vírgenes y de memoria, de pacientes con IVC y controles, los niveles de pS6 basales y tras estimulación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sujetos del estudio

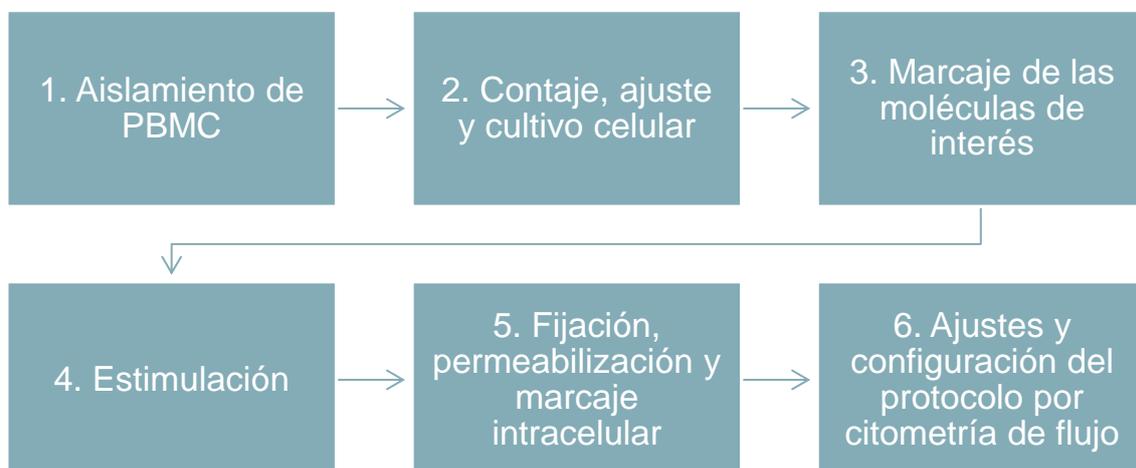
El presente proyecto se ha realizado a partir de muestras de sangre periférica obtenidas de controles sanos y pacientes con IVC previa firma del correspondiente consentimiento informado. Los pacientes son estudiados y tratados de forma regular mediante la administración de gammaglobulina endovenosa en el Hospital Universitario Son Espases (HUSE).

El estudio se diseñó y realizó siguiendo las bases establecidas en la Declaración de Helsinki con la correspondiente aprobación del Comité de Ética en Investigación Clínica (CEIC).

4.2. Estandarización del protocolo

Se ha procedido a la estandarización de un protocolo que permita evaluar los niveles de fosforilación de la proteína intracelular S6, mediante técnica de citometría de flujo. La estandarización se ha llevado a cabo con linfocitos B de controles sanos.

A continuación, se esquematizan los pasos requeridos para llevar a cabo dicho procedimiento:



4.2.1. Aislamiento de PBMC

En primer lugar, se procedió a la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante la creación de un gradiente de densidad por centrifugación a partir del uso del reactivo Ficoll (Figura 4).

Figura 4. Aislamiento de PBMC.



En el diagrama se esquematiza el proceso de obtención de PBMCs a partir de sangre periférica basado en un protocolo de centrifugación en gradiente de densidad mediante el uso del polisacárido Ficoll.

Dicha ilustración ha sido creada con BioRender.com

Como se indica en la Figura 4, la sangre periférica se diluye con suero fisiológico (1:1) y se deposita sobre el reactivo Ficoll en un tubo apto para centrifuga. A continuación, se centrifuga a 1.100 rpm (revoluciones por minuto) 20 minutos y sin freno obteniéndose cuatro fases; las cuales, ordenadas de la región superior a la inferior del tubo son: plasma, células mononucleares, Ficoll y, por último, granulocitos y eritrocitos. Con una pipeta pasteur recogemos cuidadosamente la capa correspondiente a los PBMCs (linfocitos y monocitos) y realizamos dos lavados, uno con PBS y otro con medio RPMI.

4.2.2. Contaje, ajuste y cultivo celular

Una vez aisladas las células mononucleares, se realiza un contaje celular con la cámara de Neubauer y se ajusta la concentración a $1 \cdot 10^6$ células/mL con medio RPMI enriquecido con suero fetal bovino (1:10) y con los antibióticos penicilina/estreptomina (dilución 1:100 según indicaciones de la casa comercial). Para llevar a cabo el protocolo, se recomienda una concentración aproximada de $5 \cdot 10^5$ células/ensayo. Por lo tanto, se siembran 500 μ L de la suspensión celular en placas de 24 pocillos y se dejan reposar hasta el día siguiente en incubadora a 37 °C.

4.2.3. Marcaje de las moléculas de interés

Dado que la citometría de flujo permite el análisis simultáneo de múltiples variables, podemos marcar en la misma muestra proteínas de superficie específicas para poder identificar las poblaciones a estudio y, además, marcar otras moléculas utilizando sustancias fluorescentes, en este caso, live/dead.

En la Tabla 1 se detallan las moléculas de interés para este protocolo con sus respectivas funciones.

Tabla 1. Moléculas de interés.

	Molécula	Función
Moléculas de superficie	CD19	Proteína de superficie expresada por todas las células del linaje B. Permite identificar la población linfocitaria B.
	CD27	Proteína de superficie expresada por los linfocitos B de memoria (CD27 ⁺). Permite diferenciar las subpoblaciones de linfocitos B vírgenes (CD27 ⁻) y de memoria (CD27 ⁺).
	IgD	Discriminación de las poblaciones de linfocitos B de memoria que han efectuado el proceso de cambio de clase (IgD ⁻) y las que no (IgD ⁺).
Molécula de interés	Live/Dead	Marcador de células viables.

Tras dejar las células en reposo, se recoge el contenido de cada pocillo en un tubo Falcon de citometría y se procede al marcaje con live/dead, 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras lo cual, se realiza un lavado con PBS y se marcan las moléculas de superficie con anti-CD19, anti-CD27 y anti-IgD incubando la muestra 15 minutos a temperatura ambiente. Se realiza nuevamente un lavado y se procede a la estimulación de la muestra.

4.2.4. Estimulación

Para evaluar la fosforilación es necesario estimular la vía de señalización correspondiente. Para ello, se utiliza la siguiente batería de estímulos:

- Anti-BCR (15 µg/mL)
- IL-21 (100 ng/mL)
- Anti-BCR (15 µg/mL) e IL-21 (100 ng/mL)
- Anti-CD40 (1 µg/mL)
- IL-21 (100 ng/mL) y anti-CD40 (1 µg/mL)

La estimulación se llevó a cabo durante 15 minutos a 37 °C. En cada ensayo se procesa de forma paralela una muestra sin estimular a modo de control.

4.2.5. Fijación, permeabilización y marcaje intracelular

Una vez estimulada la muestra, se procede a la fijación y permeabilización para el marcaje de la proteína intracelular de interés (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados.

Molécula	Función
pS6	Anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína S6 humana, de tipo IgG1k, sintetizado en ratón BALB/c y marcado con el fluorocromo BV450. Permite la detección del nivel de fosforilación de la proteína S6 en residuos de serinas (Ser) clave, Ser235 y Ser236.
Isotipo	Anticuerpo anti-KLH (del inglés <i>keyhole limpet hemocyanin</i>) de tipo IgG1k marcado con BV450 sintetizado en ratón BALB/c. El isotipo no reconoce ninguna proteína presente en la muestra, aunque sí que presenta las cualidades del anticuerpo anti-pS6. Permite verificar que la señal de la detección del anti-pS6 se debe a un incremento específico derivado de la interacción antígeno-anticuerpo.

Siguiendo con el protocolo, tras la estimulación, se procede a la fijación con 500 μ L de BD Cytotfix™ incubando 10 minutos a 37 °C. Lavamos, permeabilizamos con 1 mL de BD Perm/Wash™ Buffer y marcamos con 2,5 μ L de anti-pS6 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se procesa de forma paralela muestra marcada con un isotipo.

4.2.6. Ajustes y configuración del protocolo por citometría de flujo

Las muestras marcadas son adquiridas por el citómetro de flujo BD FACSLytic™ con el software BD FACSuite™.

La estandarización del protocolo requirió la elaboración previa de un protocolo de adquisición (creación de *Tube settings* y *Reference Settings*) y un protocolo de análisis (software BD FACSuite™).

4.3. Estudio de pacientes y controles

Una vez estandarizado el protocolo, detallado anteriormente, se procedió al estudio de 7 controles sanos y 3 pacientes con IVC. Se debe tener en cuenta que se trata de estudios preliminares, con un tamaño de muestra limitado.

4.4. Análisis de los resultados

Los datos se han analizado utilizando los software BD FACSuite™ y BD FlowJo™; para el posterior análisis estadístico, se ha realizado usando la versión 8.0.1 del programa Graphpad Prism.

Los niveles de pS6 se expresan normalizados como:

$$\text{Fluorescencia relativa} = \frac{\text{fluorescencia de la muestra estimulada} - \text{fluorescencia isotipo}}{\text{fluorescencia sin estimular}}$$

Los datos se expresan con el valor de la media y la desviación típica para cada grupo y se comparan entre sí con los tests no paramétricos t-test y Krustal-Wallis. Se considera un p-valor menor a 0,05 como estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Optimización del protocolo

5.1.1. Elección de los fluorocromos

Las muestras se procesaron utilizando el citómetro BD FACSLytic™ de última generación, el cual lleva incorporados tres láseres (violeta, azul y rojo) que permiten el análisis simultáneo en una misma muestra de hasta 12 parámetros: SSC, FCS y 10 canales de fluorescencias que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Fluorocromos compatibles con los canales de fluorescencias del citómetro BD FACSLytic™ 11.

Láser	Violeta (405 nm)	Azul (488 nm)	Rojo (638 nm)
Fluorocromos	BV450	FITC	APC
	BV500	PE	APC-R700
	BV605	PerCP-Cy5.5	APC-Cy7 / APC-H7
		PE-Cy7	

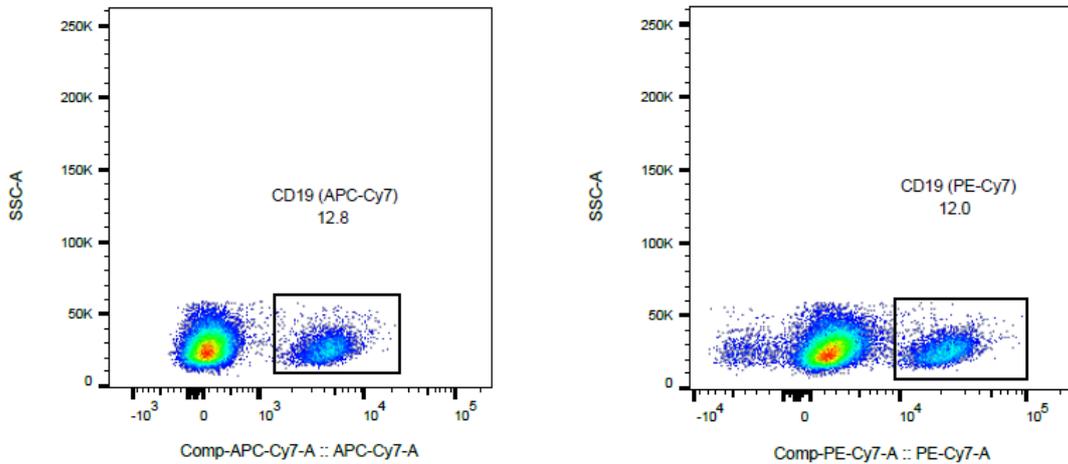
A partir del amplio abanico de fluorocromos disponibles, en primer lugar, se procedió a la selección de anticuerpos monoclonales (Tabla 4) de modo que el solapamiento entre los espectros de absorción y emisión de los distintos fluorocromos fuera mínimo.

Tabla 4. Fluorocromos y monoclonales seleccionados.

Fluorocromo	Monoclonal
BV500	Live/Dead
BV605	Anti-CD27
PE-Cy7 APC-Cy7	Anti-CD19
FITC	Anti-IgD
BV450	Isotipo
BV450	Anti-pS6

Como se puede observar en la Tabla 4, se disponía de dos anticuerpos monoclonales anti-CD19 diferentes (conjugados con PE-Cy7 y APC-Cy7) compatibles con el resto de fluorescencias. Se testearon paralelamente y como se puede apreciar en la Figura 5, el marcaje con ambos fluorocromos permite distinguir sin problema la población B (CD19⁺). Se seleccionó el monoclonal conjugado a APC-Cy7 por existir mayor disponibilidad en el laboratorio en particular.

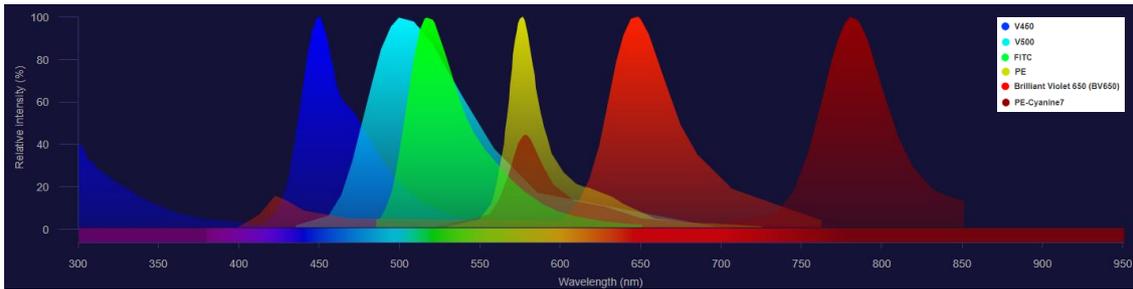
Figura 5. Resultados del marcaje utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD19 conjugados con APC-Cy7 y PE-Cy7, respectivamente.



Dicha ilustración ha sido obtenida mediante el software BD FlowJo™

Entonces, los espectros de emisión de los fluorocromos seleccionados son los que se detallan a continuación en la Figura 6.

Figura 6. Espectro de emisión de los fluorocromos seleccionados.



Espectros de emisión de los fluorocromos conjugados a los anticuerpos monoclonales usados para marcar las proteínas de interés en el presente protocolo.

Dicha ilustración ha sido creada con el programa Fluorescence SpectraViewer de la página web de ThermoFisher SCIENTIFIC.

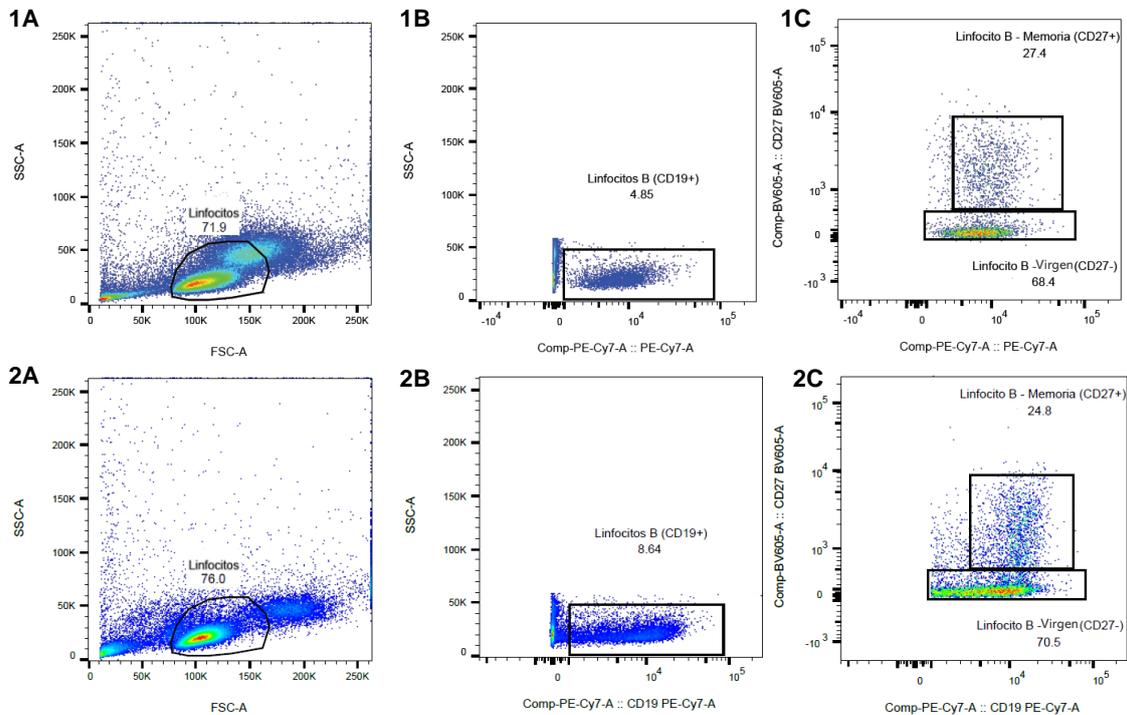
5.1.2. Optimización de la duración del protocolo

Con el fin de reducir la duración del protocolo se propuso realizar de forma simultánea la estimulación de la muestra y el marcaje con los anticuerpos monoclonales de superficie (anti-CD19 y anti-CD27).

De este modo, se plantean dos alternativas (consecutiva y simultánea):

- Realizar en primer lugar el marcaje con los anticuerpos monoclonales de superficie (anti-CD19 y anti-CD27) con su correspondiente incubación de 15 minutos. Tras este paso, se realizaría un lavado de la muestra y se procedería a la estimulación durante 15 minutos a 37 °C (Figura 7 paneles 1A, 1B y 1C).
- Marcaje con los anticuerpos monoclonales de superficie (anti-CD19 y anti-CD27) y estimulación simultánea de la muestra en una única incubación de 15 minutos a 37 °C (Figura 7 paneles 2A, 2B y 2C).

Figura 7. Resultados de realizar el marcaje de superficie (CD19 y CD27) y estimular de forma simultánea o consecutiva.



La figura ilustra los resultados obtenidos tras realizar el marcaje de superficie (anti-CD19 y anti-CD27) y estimular de forma consecutiva (1) o simultánea (2). **A.** Los gráficos de puntos muestran los parámetros FSC y SSC para identificar los linfocitos de la muestra. **B.** Identificación de la población linfocitaria B por la expresión del CD19. **C.** Identificación de las poblaciones de linfocitos B vírgenes (CD27⁻) y de memoria (CD27⁺) por la expresión del CD27.

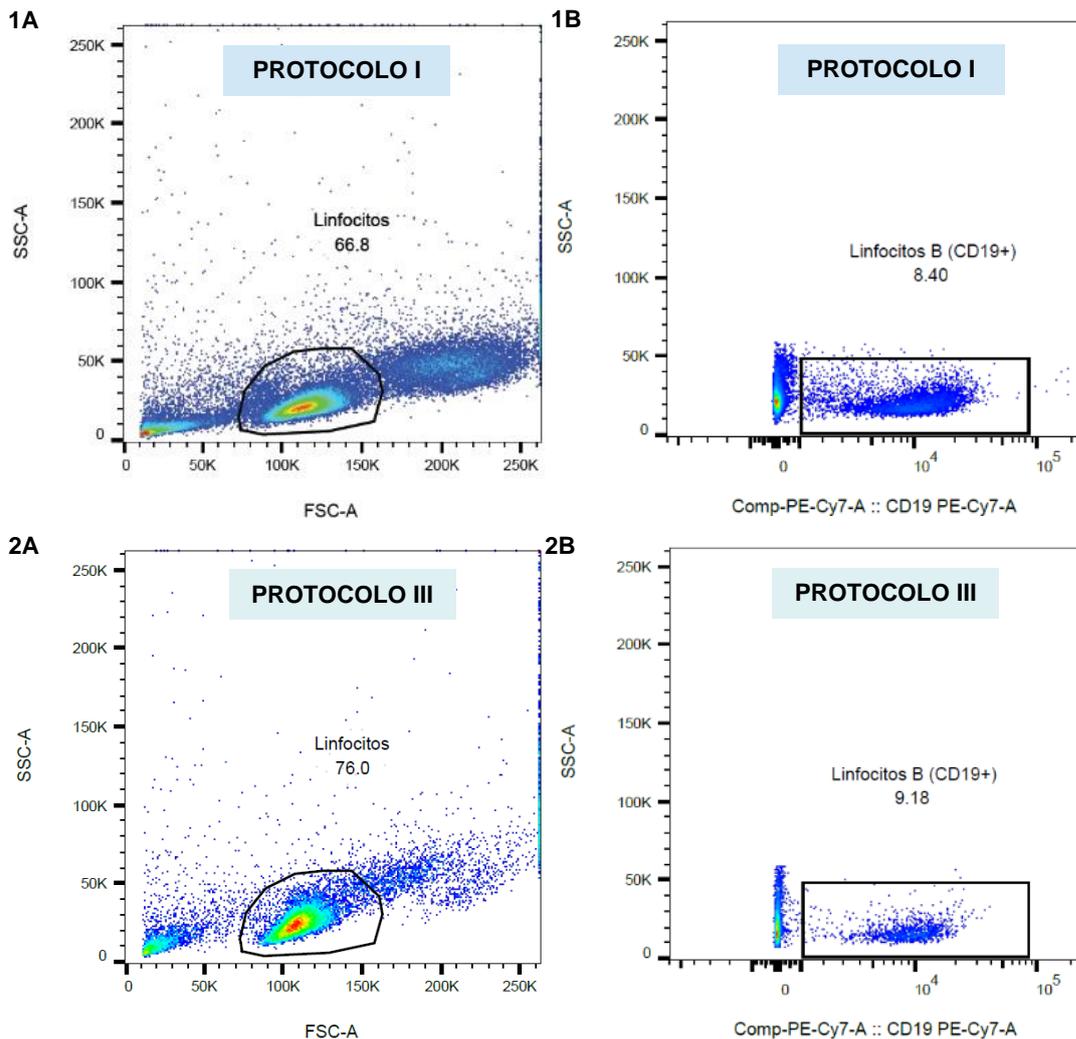
Dicha ilustración ha sido obtenida mediante el software BD FlowJo™

Dado que la modificación propuesta no solo no altera los resultados, sino que además se pierden menos células durante la realización del protocolo (Figura 7), se decidió fusionar ambos pasos permitiendo optimizar la duración del ensayo.

5.1.3. Optimización del protocolo de fijación y permeabilización

Dada la complejidad que supone la detección de la fosforilación de proteínas intracelulares, la casa comercial propuso varios kits para realizar la fijación y permeabilización de la muestra (Protocolos I y III para PBMC humanas de BD Phosflow™). La principal diferencia entre ambos reside en el reactivo de permeabilización; el primero es más suave ya que se basa en el uso de detergentes; mientras que, el segundo es más agresivo dado que se trata de un método basado en el uso de alcohol. Por tanto, se comparó la realización del protocolo con los reactivos correspondientes de ambos protocolos (Figura 8).

Figura 8. Resultados de los Protocolos I y III para PBMC humanas de BD Phosflow™.



Los resultados obtenidos tras aplicar los protocolos I (1) y III (2) para PBMC humanas de BD Phosflow™ aparecen ilustrados en la figura. **A.** Los gráficos de puntos muestran los parámetros FSC y SSC para identificar los linfocitos de la muestra. **B.** Identificación de la población linfocitaria B por la expresión del CD19.

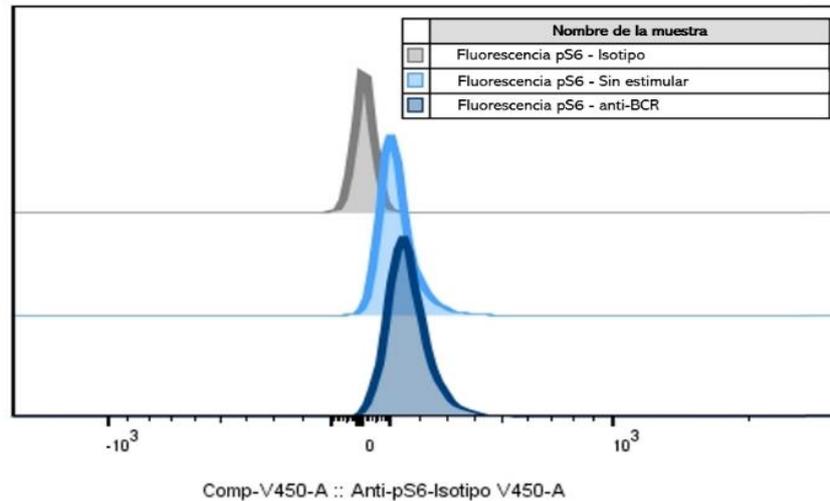
Dicha ilustración ha sido obtenida mediante el software BD FlowJo™

Los resultados denotan que protocolo III es demasiado agresivo dado que produce una gran pérdida de células (Figura 8), por lo que el protocolo de elección fue el I.

5.1.4. Comprobación

Para concluir la estandarización y optimización del protocolo, se comprobó que existían claras diferencias en una misma muestra, sin estimular y estimulada con anti-BCR, marcada paralelamente con el isotipo o el anticuerpo anti-pS6. En la Figura 9 puede apreciarse un incremento específico de la fosforilación de la proteína S6 en respuesta a la estimulación con BCR.

Figura 9. Fosforilación de la proteína S6.



Histograma con la intensidad media de fluorescencia de una muestra marcada con el isotipo (gris) o con el anticuerpo monoclonal anti-pS6 en una muestra sin estimular (azul claro) o estimulada con anti-BCR (azul oscuro).

Dicha ilustración ha sido obtenida mediante el software BD FlowJo™

5.2. Resultados de la fosforilación de S6 en controles sanos

En primer lugar, se evaluó la fosforilación de la proteína S6 en linfocitos B vírgenes (CD19⁺ CD27⁻) y de memoria (CD19⁺ CD27⁺) de controles sanos tras la aplicación de una batería de estímulos.

Describimos un aumento estadísticamente significativo de la fosforilación de la proteína S6 tras estimulación con anti-BCR en la población de linfocitos B vírgenes en comparación con la muestra sin estimular. También se observa un incremento en la fosforilación de la proteína S6 en respuesta al estímulo anti-BCR e IL-21, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. La estimulación con IL-21, anti-CD40 y anti-CD40 e IL-21 no parece incrementar la fosforilación de S6 (Figura 10).

De forma similar, en la población de linfocitos B de memoria se encuentra un incremento en los niveles de fosforilación de S6 tras la estimulación con anti-BCR y anti-BCR e IL-21, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 10).

Figura 10. Incremento de los niveles de fosforilación de S6 en linfocitos B de controles sanos.

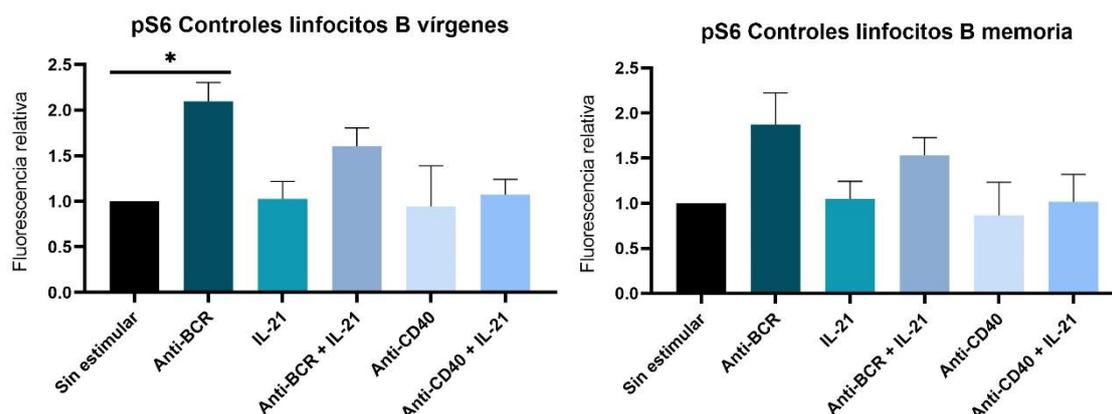


Diagrama de barras que representa el incremento de fosforilación de la proteína S6 en linfocitos B vírgenes (CD19⁺ CD27⁻) y de memoria (CD19⁺ CD27⁺) en controles sanos tras estimulación con anti-BCR, IL-21, anti-BCR e IL21, anti-CD40 y anti-CD40 e IL-21.

5.3. Resultados de la fosforilación de S6 en pacientes con IVC

Al evaluar los niveles de fosforilación en los linfocitos B de pacientes con IVC observamos, a diferencia de lo descrito anteriormente en controles sanos, que la estimulación con anti-BCR y anti-BCR e IL-21 no induce estimulación de la proteína S6 ni en la población de linfocitos B vírgenes ni en la de memoria. Sorprendentemente, se describe un ligero incremento de la fosforilación en respuesta a anti-CD40 y anti-CD40 e IL-21, pese a que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los estímulos usados (Figura 11).

Figura 11. Incremento de la fosforilación de S6 en linfocitos B de pacientes con IVC.

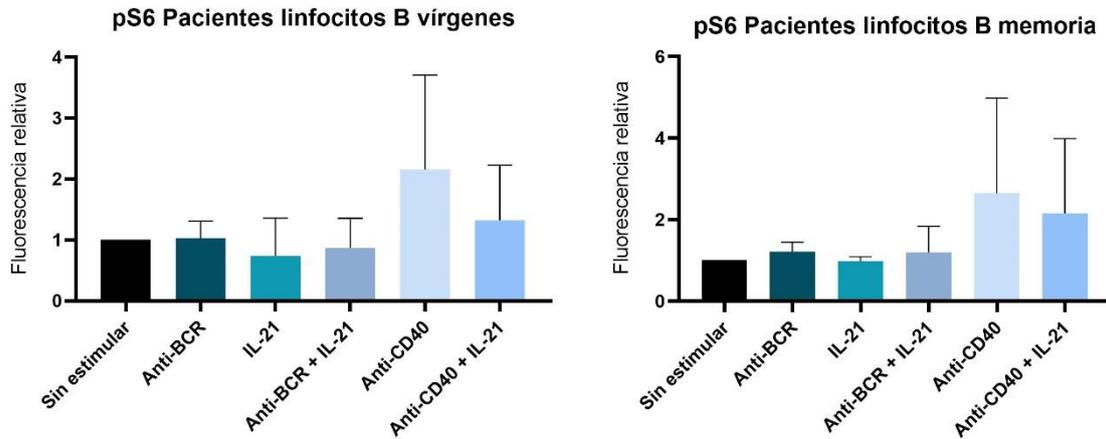


Diagrama de barras que representa el incremento de fosforilación de la proteína S6 en linfocitos B vírgenes (CD19⁺ CD27⁻) y de memoria (CD19⁺ CD27⁺) en pacientes con IVC tras estimulación con anti-BCR, IL-21, anti-BCR e IL-21, anti-CD40 y anti-CD40 e IL-21.

5.4. Resultados comparativos de la fosforilación de S6 entre controles y pacientes

Finalmente, se ha realizado una comparativa entre pacientes y controles para aquellos estímulos que inducen fosforilación en la proteína S6. Como se puede observar en la Figura 12, los pacientes tienen menores niveles de fosforilación de la proteína S6 en respuesta a anti-BCR y anti-BCR e IL-21 en las poblaciones de linfocitos B vírgenes y de memoria, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Figura 12. Resultados comparativos del incremento de los niveles de fosforilación de S6 en linfocitos B de controles y pacientes.

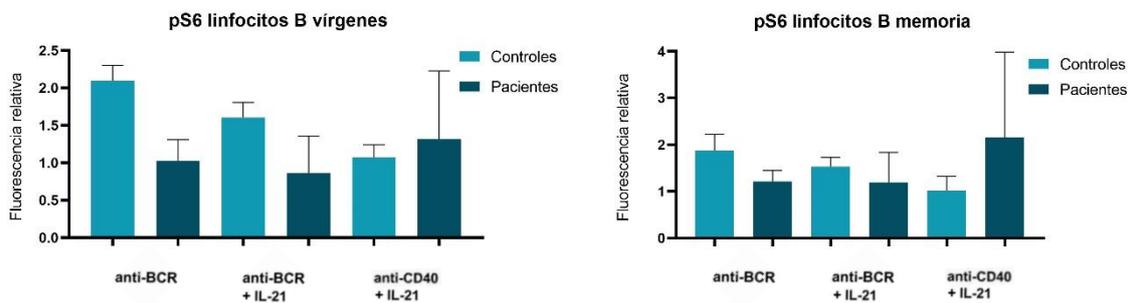


Diagrama de barras que representa el incremento de fosforilación de la proteína S6 en linfocitos B vírgenes (CD19⁺ CD27⁻) y de memoria (CD19⁺ CD27⁺) en controles sanos (azul claro) y pacientes con IVC (azul oscuro) tras estimulación con anti-BCR, anti-BCR e IL-21 y anti-CD40 e IL-21.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estandarizado un método para evaluar los niveles de fosforilación de la proteína S6 mediante citometría de flujo. Además, en linfocitos B vírgenes de controles sanos, describimos un incremento de los niveles de fosforilación de S6 tras estimulación con anti-BCR. Los pacientes con IVC estudiados parecen presentar una alteración en los niveles de fosforilación de S6 tras estimulación.

Se han descrito alteraciones en diversas poblaciones celulares del sistema inmunitario como posible causa de la IVC. Sin embargo, el hallazgo más consistente es un defecto en el proceso de diferenciación del linfocito B a célula de memoria y/o célula plasmática productora de anticuerpos. La diferenciación y activación del linfocito B ocurre en los órganos linfoides secundarios y requiere una primera señal activadora a través del BCR y una segunda señal proporcionada por el linfocito T a través de moléculas coestimuladoras de membrana (CD40L) y/o interleucinas (IL-21). La integración de estas señales recibidas activa distintos programas transcripcionales, que determinan su supervivencia, tráfico, proliferación y diferenciación final a células de memoria o plasmáticas productoras de anticuerpos.

La vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR/S6 es esencial para el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de diferentes poblaciones del sistema inmunitario. Defectos en componentes de esta cascada de señalización se asocian a inmunodeficiencias primarias^{7,8}. La proteína mTOR integra las señales del microambiente con el fin de modular el crecimiento, proliferación y metabolismo celular¹². La proteína S6, uno de los principales sustratos del complejo mTORC1 junto con 4E-BP1, es capaz de promover rutas biosintéticas y presenta un papel crucial en la supervivencia celular dado que es un inhibidor de la vía apoptótica mediada por Bcl-2¹³. Estos cambios han sido más extensamente estudiados en linfocitos T humanos, mientras que pocos estudios han abordado el tema en linfocitos B humanos⁸.

Nuestros resultados en controles sanos concuerdan con este hecho dado que la estimulación de linfocitos B vírgenes con los estímulos anti-BCR y anti-BCR e IL-21 producen un incremento de los niveles de fosforilación de la proteína S6, reflejando la activación de la vía (PI3K)/AKT/mTOR/S6. Este incremento se observa también en los linfocitos B de memoria, aunque con menor intensidad, probablemente debido a que se trata de células más diferenciadas.

Si bien, el estudio es preliminar y con un tamaño muestral muy limitado, los resultados parecen señalar que los pacientes con IVC no serían capaces de incrementar de forma óptima los niveles de fosforilación de S6 en respuesta a estímulos como el anti-BCR y anti-BCR e IL-21. Estos datos concuerdan con los publicados por Shuling et. al. donde la inhibición de mTORC1/mTORC2 en modelos murinos provoca un fenotipo de inmunodeficiencia con alteraciones en la proliferación y migración linfocitaria junto con hipogammaglobulinemia¹⁴. Además, la deficiencia LRBA, causante del fenotipo clínico de IVC y autoinmunidad, pertenece al grupo de inmunodeficiencias denominadas "TORopatías inmunes" causadas por defectos en componentes de la vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR/S6⁸. En esta inmunodeficiencia se produce hipogammaglobulinemia y una reducción de la población B de memoria con mayor tendencia a apoptosis⁸.

Estos resultados indican que la proteína S6 estaría implicada en los procesos de activación y diferenciación celular del linfocito B y que su estudio tendría aplicación en el campo de las inmunodeficiencias primarias. Los pacientes con IVC podrían presentar alteraciones en la vía de señalización mTOR que explicaran, en parte, el fallo en la diferenciación de sus linfocitos B y en la producción de anticuerpos.

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha logrado la estandarización de un ensayo por citometría de flujo para el análisis de la fosforilación de la proteína S6 en respuesta a diferentes estímulos. Este ensayo tiene aplicabilidad en el campo de las inmunodeficiencias primarias.
2. Los linfocitos B vírgenes de controles sanos incrementan los niveles de fosforilación de S6 tras estimulación con anti-BCR.
3. Los pacientes con IVC estudiados parecen presentar una alteración en los niveles de fosforilación de S6 tras estimulación con anti-BCR e IL-21.

7.1. Limitaciones

La principal limitación de este trabajo es el pequeño tamaño de la muestra. Será necesario estudiar un mayor número de pacientes y controles para confirmar las tendencias descritas en este trabajo.

7.2. Impacto y perspectivas futuras

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria de las Islas Baleares (IdISBa) en el marco del proyecto "Metabolismo, integridad mitocondrial y autofagia en linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común", PI19/00825. IP: Joana María Ferrer.

Este protocolo podrá ser incorporado a la rutina del laboratorio de inmunología para el estudio de inmunodeficiencias primarias.

Además, actualmente existen pocos trabajos que estudien la fisiología y metabolismo en linfocitos B humanos, por tanto, este trabajo servirá para iniciar un estudio más exhaustivo que ayude a comprender el papel de la vía (PI3K)/AKT/mTOR/S6 en linfocitos B tanto de controles sanos como de pacientes con IVC.

Finalmente, este estudio ayudará a alcanzar los objetivos del proyecto de investigación en el que se enmarca.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, S. P. *Inmunología celular y molecular*. (2018).
2. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, S. P. *Inmunología básica: funciones y trastornos del sistema inmunitario*. (2017).
3. Yong, P. F. K., Thaventhiran, J. E. D. & Grimbacher, B. 'A Rose is a Rose is a Rose,' but CVID is Not CVID. *Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we Know in 2011? Advances in Immunology* vol. 111 (Elsevier Inc., 2011).
4. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G & Aghamohammadi A. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol* 30, 14–34 (2020).
5. ESID - Sociedad Europea de Inmunodeficiencias. <https://esid.org/Working-Parties/Clinical-Working-Party/Resources/Diagnostic-criteria-for-PID2>.
6. Ahn, S. & Cunningham-Rundles, C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert Review of Clinical Immunology* vol. 5 557–564 (2009).
7. Iwata, T. N., Ramírez-Komo, J. A., Park, H. & Iritani, B. M. Control of B lymphocyte development and functions by the mTOR signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 35, 47–62 (2017).
8. Jung, S., Gámez-Díaz, L., Proietti, M. & Grimbacher, B. 'Immune TOR-opathies,' a novel disease entity in clinical immunology. *Frontiers in Immunology* vol. 9 (2018).
9. Jocelyn Carolina, P.-L., Wendolaine, S.-C., Héctor, R.-R. & Carlos, J. *Portafolio Científico*. vol. 18.
10. Clemente, A., Pons, J., Lanio, N., Matamoros, N. & Ferrer, J. M. CD27+ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling. *Clin. Exp. Immunol.* 174, 97–108 (2013).
11. BD FACSLytic™ | Clinical Cell Analyzer. <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/clinical-cell-analyzers/facslytic>.
12. Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature Reviews Immunology* vol. 3 317–330 (2003).
13. Huang, K. & Fingar, D. C. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 36 79–90 (2014).
14. Zhang, S. *et al.* Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production. *Blood* 117, 1228–1238 (2011).