



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**“Análisis de anticuerpos y subpoblaciones de
linfocitos B en el intestino delgado de ratones CD38^{-/-}”**

Tesis

Que presenta

Q.F.B. Francisco Huerta-Constantino

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de la Tesis

Dr. Marco Antonio Vega López.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo.

Ciudad de México

Septiembre, 2018

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas del Dr. Marco Antonio Vega en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav-IPN y en el Laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo en el Departamento de Biomedicina Molecular, con financiamiento parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. El autor fue becario CONACyT CVU: 780757 durante sus estudios de maestría.

Dr. Marco Antonio Vega-López

Director de tesis

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

Cinvestav-IPN

Dr. Leopoldo Santos-Argumedo

Codirector de tesis

Departamento de Biomedicina Molecular

Cinvestav-IPN

Comité tutorial

Dr. Víctor Tsutsumi-Fujiyoshi

Departamento de Infectómica y
Patogénesis Molecular

Cinvestav-IPN

Dra. Patricia Talamás-Rohana

Departamento de Infectómica y
Patogénesis Molecular

Cinvestav-IPN

Agradecimientos

Del laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular:

Al Dr. Marco Antonio Vega-López, por su dirección y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Biol. María del Carmen Ramírez Estudillo, por el soporte técnico en la estandarización de los métodos empleados en esta tesis, así como en la ayuda para la crítica y análisis de los resultados obtenidos.

Al técnico Luis Alberto Hernández González, por su ayuda en el mantenimiento del equipo y materiales de experimentación, así como el soporte técnico brindado.

A mis compañeros de laboratorio: M.C. Vladimir Herman Miguel, M.C. Mario Frago Saavedra, M.C. América Ruíz Salgado, por las críticas y apoyo durante el proyecto.

Del laboratorio del Dr. Leopoldo Santos-Argumedo del Departamento de Biomedicina Molecular:

Al Dr. Leopoldo Santos-Argumedo por su dirección y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Romero-Ramírez por el soporte técnico en la estandarización de los métodos empleados en esta tesis, así como en la ayuda para la crítica y análisis de los resultados obtenidos.

Al técnico Lenin Estudillo Díaz, por su ayuda en el mantenimiento del equipo y materiales de experimentación, así como el soporte técnico brindado.

A mis compañeros de laboratorio: Q.F.B. Carlos Emilio Miguel Rodríguez, M.C. Zayda Piedra Quintero, M.C. Daniel Alberto Girón Pérez, por las críticas y apoyo durante el proyecto. En especial al M.C. Eric Saúl Sánchez Salguero por el soporte técnico brindado.

De la Unidad de Reproducción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Cinvestav, Zacatenco:

A los M.V.Z. Octavio Ramos y David Barrios por su asesoría en el manejo técnico del modelo experimental.

Del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular:

A los asesores de este trabajo: Dr. Víctor Tsutsumi-Fujiyoshi, Dra. Patricia Talamás-Rohana, por sus comentarios y observaciones que ayudaron a culminar el proyecto.

A la Dra. Abigail Betanzos Fernández por la crítica y apoyo durante la realización de este proyecto.

A los profesores del departamento que participaron durante los seminarios y evaluaciones pertinentes y al servicio administrativo y de intendencia por su servicio y apoyo durante mi formación académica.

Dedicatoria

A mi familia.

Índice

Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
Introducción	1
1. Marco teórico	2
1.1 Introducción a la inmunidad	2
1.2 De linfocitos B a células plasmáticas	2
1.3 Expresión de CD38 en linfocitos B	4
1.4 Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)	7
2. Justificación	12
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo General	14
4.2 Objetivos particulares	14
5. Materiales y métodos	15
5.1 Diseño experimental	15
5.2 Animales de experimentación	16
5.3 Prueba de ELISA	16
5.4 Ensayos de Citometría de flujo	19
6. Resultados	22
6.1 La ausencia de CD38 no afecta las concentraciones de inmunoglobulinas séricas	22
6.2 Los ratones CD38 ^{-/-} presentan concentraciones alteradas de anticuerpos IgA e IgM en el lumen intestinal comparados contra el fenotipo silvestre.	22
6.3 Rendimiento de poblaciones totales en bazo, cavidad peritoneal, placas de Peyer y lámina propia	23
6.4 Análisis de poblaciones linfocitarias	26

6.5 Los linfocitos B totales de ratón CD38 ^{-/-} se encuentran disminuidos en la cavidad peritoneal	28
6.6 Las subpoblaciones de linfocitos B en la cavidad peritoneal de ratones CD38 ^{-/-} se encuentran disminuidas	31
6.7 Las proporciones de células B2 y B1b se encuentran alteradas en las placas de Peyer de ratones CD38 ^{-/-} .	32
6.8 El ratón CD38 ^{-/-} presenta menos células T en las placas de Peyer que la contraparte silvestre	33
6.9 El ratón CD38 ^{-/-} presenta menos células T en las placas de Peyer que la contraparte silvestre	34
6.10 El ratón CD38 ^{-/-} presenta mayor cantidad de linfocitos B2 en la lámina propia del intestino delgado que la contraparte silvestre	35
7. Discusión	37
8. Conclusiones	41
9. Perspectivas	42
10. Referencias bibliográficas	43
11. Anexos	48
11.1 Estandarización de digestión enzimática de lámina propia de intestino delgado murino	48

Lista de abreviaturas

µg	Microgramo
µL	Microlitro
Ab	Anticuerpo
ADP	Adenosina Difosfato
ADPr	Adenosina Difosfato Ribosa
APC	Células Presentadora de Antígeno
APRIL	Un Ligando Inductor de la Proliferación
BAFF	Factor Activador de célula B perteneciente a la Familia de TNF
BCR	Receptor de Células B
BM	Médula ósea
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cADPr	Adenosina Difosfato Ribosa Cíclico
CD	Cúmulo de Diferenciación
CLP	Progenitor Común Linfoide
cm	Centímetros
CSR	Cambio de isotipo
CXCL13	Ligando 13 para la Quimiocina con motivo C-X-C
CXCR4	Receptor 4 para la Quimiocina con motivo C-X-C
CXCR5	Receptor 5 para la Quimiocina con motivo C-X-C
DC	Célula Dendrítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmuno-Absorbente Ligado a Enzima
FAE	Epitelio Asociado al Folículo
FO	Folicular
G	Fuerzas G
GALT	Tejido Linfoide Asociado a Intestino
GC	Centro Germinal
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSC	Célula Madre Hematopoyética
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
ILF	Folículo Linfoide Aislado
LP	Lámina Propia
LPS	Lipopolisacáridos
LTi	Célula inductora de Tejido Linfoide
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas
mL	Mililitros
MLN	Ganglio Linfático Mesentérico

MPP	Progenitor Multipotencial
MZ	Zona marginal
NA	Ácido Nicotínico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sodio
NAADP	Ácido Nicotínico Adenina Dinucleótido Fosfato
NAbs	Anticuerpos naturales
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NK	Asesinas Naturales
PBS	Solución Tampón de Fosfatos
PC	Célula Plasmática
pH	Potencial de Hidrógeno
pIgR	Receptor de Inmunoglobulinas Poliméricas
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PP	Placas de Peyer
SHM	Hipermutación Somática
sIgA	IgA secretoria
SPF	Libre de Patógenos Específicos
T1	Transicional 1
T2	Transicional 2
Th	T cooperadora
TI	T independiente
TI-2	T independiente tipo 2
TLCK	Tosil lisil clorometil cetona
TLR	Receptor Tipo Toll
TPCK	Tosil fenilalanil clorometil cetona
WT	Fenotipo Silvestre

Lista de figuras

Figura 1	Ontogenia de células B1 y B2	3
Figura 2	Expresión de CD38 en el desarrollo de los linfocitos B	6
Figura 3	Sistema inmunitario del tracto gastrointestinal	10
Figura 4	Esquema general de toma de muestras y procedimiento experimental	15
Figura 5	Esquema general para el análisis estadístico	16
Figura 6	Cuantificación de IgG, IgA e IgM totales en suero de ratón	22
Figura 7	Cuantificación de IgG, IgA e IgM totales en lumen de intestino delgado de ratón	23
Figura 8	Rendimientos celulares de bazo	24
Figura 9	Rendimientos celulares de cavidad peritoneal	24
Figura 10	Rendimientos celulares de placas de Peyer	25
Figura 11	Rendimientos celulares de lámina propia de intestino delgado	25
Figura 12	Selección de poblaciones de bazo	26
Figura 13	Selección de poblaciones de cavidad peritoneal	27
Figura 14	Selección de poblaciones de placas de Peyer	27
Figura 15	Selección de poblaciones de lámina propia	28
Figura 16	Números relativos de linfocitos B totales de diferentes nichos	29
Figura 17	Números absolutos de linfocitos B totales en diferentes nichos inmunitarios	30
Figura 18	Números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en cavidad peritoneal	31
Figura 19	Números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en placas de Peyer	32
Figura 20	Cantidad de placas de Peyer y de linfocitos T y B de placas de Peyer	33
Figura 21	Números relativos de linfocitos T en diferentes nichos inmunitarios.	34
Figura 22	Números absolutos de linfocitos T en diferentes nichos inmunitarios.	35
Figura 23	Números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en lámina propia de intestino delgado	36
Figura 24	Esquema representativo de los resultados obtenidos en este proyecto	40
Figura 25	Primer lavado con EDTA	51
Figura 26	Segundo lavado con EDTA	52
Figura 27	Digestión enzimática de intestino delgado murino	53

Lista de tablas

Tabla 1	Marcadores celulares de superficie e intracelulares en diferentes etapas del desarrollo de células B humanas y murinas	5
Tabla 2	Tren de soluciones para deshidratación	50
Tabla 3	Tren de soluciones para hidratación	50

Resumen

CD38 es una glicoproteína transmembranal tipo II que posee dos dominios extracelulares, uno de ellos con función de ectoenzima que genera mensajeros de calcio y un segundo dominio implicado en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. La expresión de CD38, que se ha estudiado en el modelo murino, se modifica durante la ontogenia de los linfocitos B, donde los primeros en aparecer son los linfocitos B1, que provienen del hígado fetal y son responsables de la producción de anticuerpos "naturales" (NAbs, *Natural Antibodies*) de clase IgM, dirigidos contra antígenos glicoproteicos conservados.

En el tejido linfoide asociado a mucosas (GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissue*), estos anticuerpos (Ab, *Antibodies*) naturales están implicados en el establecimiento de la microbiota comensal y son la primera línea de defensa humoral en contra de potenciales agentes patógenos. Después de que los linfocitos B1 se establecen en la mucosa intestinal, los segundos en migrar son los linfocitos generados en médula ósea, conocidos como células B2, que llegarán al sitio inductor de la mucosa intestinal, conocido como las placas de Peyer (PP, *Peyer's Patches*). Una vez activados en este sitio, migrarán al ganglio mesentérico (MLN, *Mesenteric Lymph Node*) y en circulación sanguínea regresarán por ecotaxia a la lámina propia (LP, *Lamina Propria*) del intestino, sitio efector de la respuesta inmunitaria, donde terminarán de diferenciarse a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig, *Immunoglobulins*) de clase IgA.

Los linfocitos B1 y B2 trabajan en conjunto para mantener la homeostasis intestinal mediante la producción de anticuerpos de clase IgM e IgA respectivamente. Los estímulos de diferenciación varían de un sitio inmunitario a otro y las moléculas involucradas en la proliferación y diferenciación de linfocitos B a células productoras de anticuerpos pueden tener mayor importancia dependiendo del lugar donde se encuentren.

En este trabajo se encontró que la ausencia de CD38 afectó negativamente la cantidad de anticuerpos de clase IgA en el lumen intestinal del modelo murino, también se observó un aumento de la población de linfocitos B2 (B220⁺, CD23⁺, CD5⁻) en la lámina propia del intestino delgado. Estos datos sugieren que CD38 participa en el proceso de diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas en el GALT.

Abstract

CD38 is a type II transmembrane glycoprotein that possesses two extracellular domains, one of them functions as an ectoenzyme and its activation generates calcium messengers, the other domain has a role in B cell proliferation and differentiation. Expression of CD38 varies through B cell ontogeny, B1 B cells are the first to appear and they are generated in the fetal liver, also, they are responsible for natural IgM antibodies production, and the main target for these antibodies are glycoproteic antigens.

Humoral defense against potential pathogenic agents and the establishment of commensal microbiota in gut associated lymphoid tissue (GALT) have natural antibodies involved. After B1 B cells, bone marrow B2 B cells address the intestinal mucosa and they arrive into the gut immune inductive sites, known as Peyer's patches (PP). After activation in PP, migration to mesenteric lymph node (MLN) occurs, and therefore, recirculation through bloodstream and finally homing to the gut lamina propria (LP), the effector site of gut immune response, where these activated B2 B cells receive the proper stimuli to differentiate into IgA secreting plasma cells.

B1 and B2 B cells work together to maintain the gut homeostasis by immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies production respectively. Differentiation stimuli of B cells to antibody secreting cells varies from one immune site to another and molecules involved in these processes may have relevant roles depending on the site.

The present work showed that CD38 has a negative influence in the quantity of intestinal lumen IgA antibodies in the murine model. Likewise, an augment of B2 B cell (B220⁺, CD23⁺, CD5⁻) population was noted. This data suggests that CD38 may have a role in differentiation of B lymphocytes to plasma cells in the GALT.

Introducción

Las células que orquestan las respuestas inmunitarias adaptativas son los linfocitos T (inmunidad celular) y los linfocitos B (inmunidad humoral). Las células B se desarrollan de células madre hematopoyéticas que se originan en la médula ósea. Para completar su desarrollo, las células B inmaduras migran desde la médula ósea al bazo, pasando por dos estados transicionales. Las células B foliculares son activadas por su unión con el antígeno y se desarrollan en los centros germinales a células B de memoria o células plasmáticas.

La diferenciación de los linfocitos puede estudiarse a través del análisis de marcadores de superficie. La ectoenzima CD38 es un antígeno de diferenciación cuya expresión se encuentra restringida, pero no es exclusiva de los linfocitos B murinos. En humanos, CD38 ha sido utilizado para clasificar leucemias linfocíticas malignas, para monitorear la infección y progresión del Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) y como un blanco para el tratamiento de mieloma.

El tejido linfoide asociado a intestino posee diversas poblaciones de células B. La protección inmunitaria de la mucosa intestinal humana depende de la secreción de anticuerpos de clase IgA por células plasmáticas (PC, *Plasma Cell*) que ocupan el tejido conectivo subepitelial difuso de la lámina propia (LP, *Lamina propria*) intestinal. Se ha observado que CD38 induce la proliferación de linfocitos B maduros y su activación como receptor en linfocitos B inmaduros conduce a éstos hacia apoptosis. Se tienen datos de que existe una expresión de CD38 importante en la cavidad peritoneal y en las placas de Peyer (PP, *Peyer's Patches*), sitios poco estudiados para esta molécula. Defectos en el mantenimiento de la homeostasis intestinal podrían deberse a la ausencia de CD38.

1. Marco teórico

1.1 Introducción a la inmunidad

El balance entre el hospedero y los agentes infecciosos ha evolucionado de manera tal que ha permitido la sobrevivencia de ambos. El sistema inmunitario provee protección mediante diversos mecanismos. El tiempo de la respuesta, la especificidad y el gasto energético, han dividido al sistema inmunitario en: Innato y adaptativo. La inmunidad innata es la primera línea de defensa en contra de agentes patógenos, sus efectos son de especificidad limitada y carece de memoria. Por otra parte, la inmunidad adaptativa, en primera instancia lenta, es altamente específica y tiene la capacidad de generar memoria, característica que le permite responder de una manera más eficiente en cuestiones energéticas y temporales a infecciones reincidentes. Las células que orquestan las respuestas inmunitarias adaptativas son los linfocitos T (inmunidad celular) y los linfocitos B (inmunidad humoral) ^{1,2}.

1.2 De linfocitos B a células plasmáticas

En el humano, las células B se desarrollan a partir de las células madre hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*) que se originan en la médula ósea (BM, *Bone Marrow*). Estas HSC se diferencian primero en un progenitor multipotencial (MPP, *Multipotential Progenitor*) y después a las células conocidas como progenitores comunes linfoides (CLP, *Common Lymphoid Progenitor*) ³.

Las células B llevan a cabo dos tipos de selección mientras se desarrollan en la médula ósea. La selección positiva que ocurre a través de una señalización independiente de antígeno involucrando tanto al pre-BCR (BCR, *B Cell Receptor*) como al BCR. Si estos receptores se unen a su ligando, las células B no reciben la señalización apropiada y dejan de desarrollarse. La selección negativa ocurre a través de la unión de un antígeno propio con el BCR; si el BCR se puede unir fuertemente a un antígeno propio, las células B pueden tener varios destinos: eliminación clonal, edición de receptor, anergia, o ignorancia (las células B ignoran señales y continúan desarrollándose). Este proceso de selección negativa dirige a un estado de tolerancia central, en el cual las células B maduras no se unen con antígenos propios presentes en la médula ósea ⁴.

Para completar su desarrollo (Figura1), las células B inmaduras migran desde la médula ósea al bazo, pasando por dos estados transicionales: T1 y T2. Durante su migración al bazo y después de entrar en él, son consideradas células B T1. Durante su estancia en el bazo, las células B T1 llevan a cabo una transición a células B T2. Estas células B T2 se pueden diferenciar en células B foliculares (FO, *Follicular*) o en células B de zona marginal (MZ, *Marginal Zone*) dependiendo de las señales que reciban a través del BCR y otros receptores. Una vez diferenciadas, son consideradas células B maduras inexpertas ⁵.

En el modelo murino, las células B inmaduras saldrán de la médula ósea y entrarán en la circulación como células B transicionales. Las células B transicionales murinas se subdividen en células T1, T2 y T3, sobre la base de la expresión de marcadores de superficie celular y su función. Estas células se

pueden encontrar en la sangre y en los órganos linfoides secundarios. Las células de transición representan la fase final antes de la diferenciación a células B foliculares, de zona marginal, centro germinal (GC, *Germinal Center*) o células B de memoria ⁶.

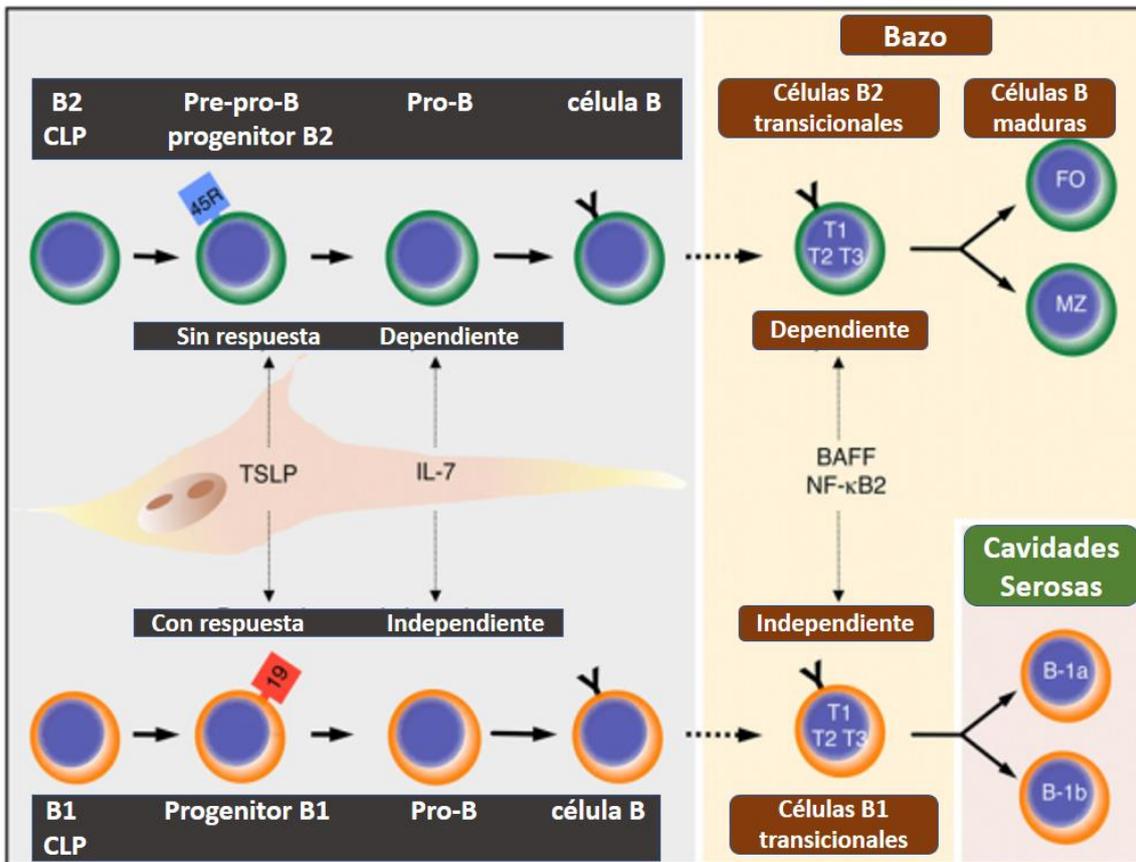


Figura 1. Ontogenia de células B1 y B2. Las células B2 son producidas en la médula ósea después del nacimiento, los CLP maduran secuencialmente, atravesando los intermediarios (no mostrados) pre-pro B, pro B y pre B, en células B inmaduras sIgM⁺. Las células sIgM⁺ migran al bazo en donde maduran a través de los intermediarios de células B2 (T1, T2 y T3) en células B FO o MZ. Las células B1 maduras son generadas de un CLP específico de hígado fetal que se diferencia secuencialmente a través de un progenitor de células B1, pro B, pre B (no mostrados) y célula B1 inmadura IgM⁺. Después, estas células maduran en el bazo a células transicionales. Las células B1 maduras que migran a las cavidades serosas adquieren los fenotipos B1a o B1b ⁷.

Las células B FO se activan por su unión con el antígeno y se desarrollan en los GC, con la ayuda de células T cooperadoras (Th, *T helper*), a células B de memoria o células plasmáticas (PC, *Plasma Cell*). La activación de las células B induce a la maquinaria de cambio de clase (CSR, *Class Switch Recombination*), modificando la afinidad del BCR y el isotipo de inmunoglobulina (Ig, *Immunoglobulin*) de IgM a IgG, IgA o IgE ⁸.

Las células B1 se encuentran principalmente en las cavidades peritoneal, pleural y en la lámina propia (LP, *Lamina Propria*) intestinal, las cuales dan lugar a células secretoras de anticuerpos (ASC, *Antibody Secreting Cells*), pero difieren de las células B convencionales (células B2) en varios modos. Las células B1

poseen un fenotipo singular de marcadores celulares, incluyendo la expresión de CD5 en células B1a, pero no en células B1b, y CD11b (en las cavidades peritoneal y pleural). Los precursores de las células B1 son abundantes en el hígado fetal y ausentes en la médula ósea adulta. Las células B1 tienen la capacidad de autorrenovarse y expresar BCR y reconocen principalmente antígenos independientes de linfocitos T de tipo 2 (TI-2, *T Independent type 2*); estas células son responsables de la producción de anticuerpos de isotipo IgM de manera “natural”, los cuales se generan en respuesta a antígenos propios, pero frecuentemente reconocen antígenos bacterianos y proveen una primera línea de defensa de anticuerpos en contra de microorganismos patógenos ⁹.

1.3 Expresión de CD38 en linfocitos B

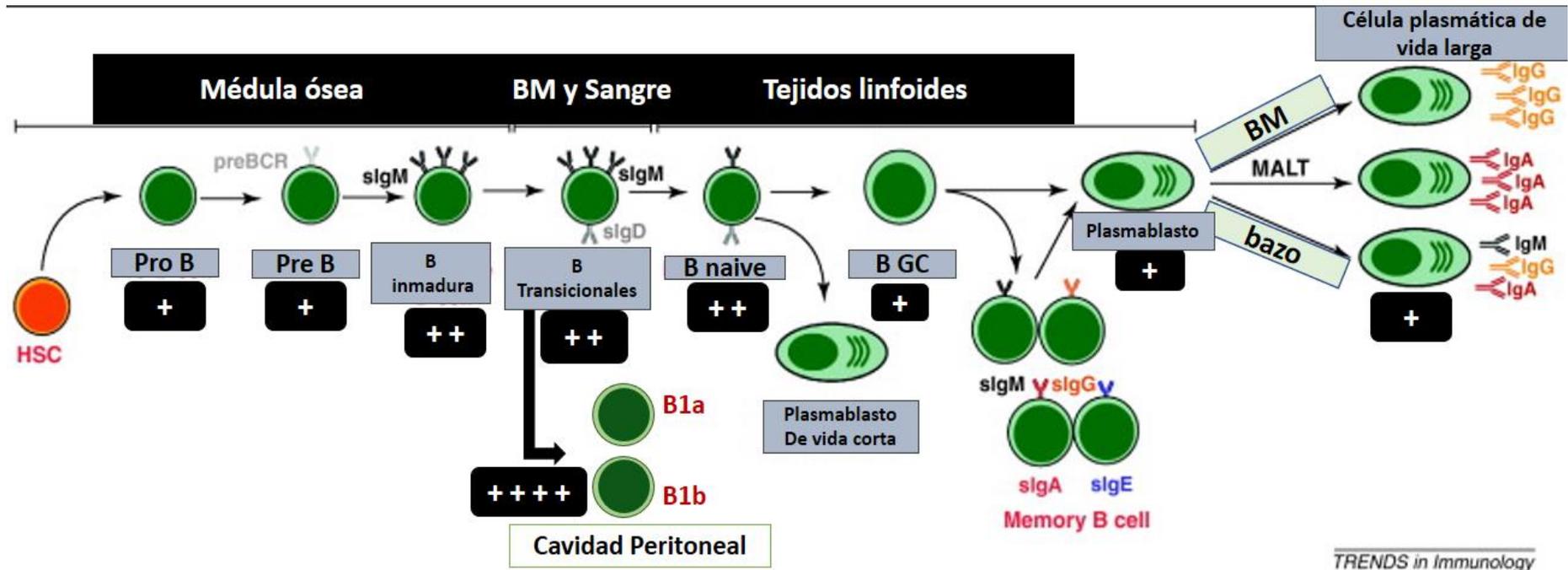
La diferenciación de los linfocitos puede ser estudiada a través del análisis de marcadores de superficie que aparecen y desaparecen entre fases discretas del proceso (Tabla 1). Estas moléculas han sido nombradas antígenos de diferenciación, y muchas de ellas poseen un número de cúmulo de diferenciación (CD, *Cluster of Differentiation*). El estudio de estas moléculas es una contribución importante para el entendimiento de la ontogenia, desarrollo y función del sistema inmunológico ^{10,11}.

CD38 es una glicoproteína transmembranal de tipo II que fue identificada por el anticuerpo monoclonal OKT10, y por esta razón, fue llamada inicialmente como antígeno T10. Muchos años después, utilizando un sistema de clonación, identificaron al antígeno T10 como el antígeno CD38. El interés preliminar en esta molécula se debió a una expresión discontinua distintiva durante la maduración de linfocitos T y B (en la Figura 2 se observa esta expresión discontinua en la ontogenia de los linfocitos B). La identificación y clonación de CD38 en el modelo murino abrió nuevas vías para investigar su papel biológico, no solo porque era más factible un mejor acercamiento utilizando ratones, sino también por la posibilidad de manipular su expresión para analizar su función en diversos procesos biológicos ¹²⁻¹⁴.

La ectoenzima CD38 es un antígeno de diferenciación cuya expresión se encuentra restringida, pero no es exclusiva de linfocitos B murinos. En humanos CD38 ha sido utilizado para clasificar leucemias linfocíticas malignas, para monitorear la infección y progresión del virus de inmunodeficiencia humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) y como un blanco para el tratamiento de mieloma. El dominio extracelular de CD38 cataboliza la conversión de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, *Nicotinamide, Adenine Dinucleotide*) a ADP-ribosa cíclico (cADPr, *cyclic Adenosine Diphosphoribose*), ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP, *Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate*), ADP-ribosa (ADPr, *ADP ribose*) y ácido nicotínico (NA, *Nicotinic Acid*). Los dos primeros son poderosos mensajeros de calcio en una amplia variedad de células. El papel de estos productos en los procesos de proliferación y diferenciación de linfocitos tanto humanos como murinos no ha sido bien explorado ¹⁰.

Tabla 1. Marcadores de superficie e intracelulares en diferentes etapas del desarrollo de células B humanas y murinas^{8,15-17}.

Tipo celular	Marcadores en humano	Marcadores en ratón
Progenitor común linfoide	CD10/Neprilisina ⁺ , CD34 ⁺ , Pax5 ⁺	Lin ⁻ , CD117/c-kit ⁻ , Sca-1/Ly6 ⁻ , Ly6D ⁻ , IL-7 R α ⁺ , Flt-3/Flk-2 ⁺
Progenitor de linfocito B	CD10/Neprilisina ⁺ , CD34 ⁺ , Pax5 ⁺	Lin ⁻ , CD117/c-kit ⁻ , Sca-1/Ly6 ⁻ , Ly6D ⁺ , IL-7 R α ⁺ , Flt-3/Flk-2 ⁺
Progenitor B1	No se han descrito para humano	Lin ⁻ , B220/CD45 R ^{low} , CD19 ⁺ , C1qR1/CD93 ⁺
Progenitor B2	No se han descrito para humano	Lin ⁻ , B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁻ , C1qR1/CD93 ⁻
Célula Pre-Pro B	CD117 ^{low} , CD10 ⁺ , CD34 ⁺ , CD38 ⁺ , Pax5 ⁺	Lin ⁻ , B220/CD45R ⁺ , CD19 ⁻ , CD24 ^{low} , CD43 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , CD117/c-kit ⁻ , CXCR4 ⁺ , Flt-3/Flk-2 ⁺ , IL-7 R α ⁺ , IgM ⁻
Célula Pro B	CD117/c-kit ^{low} , CD10/Neprilisina ⁺ , CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD24 ⁺ , CD34 ⁺ , CD38 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , IL-3 R ⁺ , IL-7 R α ⁺ , Pax5 ⁺	Lin ⁺ , B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁺ , CD24 ⁺ , CD43 ⁺ , CD117/c-kit ^{low} , CD38 ⁺ , IL-7 R α ⁺ , IgM ⁻
Célula Pre B	CD117/c-kit ⁺ , CD10/Neprilisina ⁺ , CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD24 ⁺ , CD34 ⁻ , CD38 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , IL-3 R ⁺ , IL-4 R α ⁺ , IL-7 R α ⁺ , Pax5 ⁺	Lin ⁺ , B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁺ , CD24 ⁺ , CD43 ⁻ , IL-7 R α ⁺ , CD38 ⁺ , IgM ⁻
Célula B inmadura	CD117/c-kit ⁻ , CD10/Neprilisina ⁺ , CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD21 ⁺ , CD24 ⁺ , CD27 ⁻ , CD38 ⁺ , CD40 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , IL-4 R α ⁺ , IL-7 R α ⁻	B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁺ , CD23/Fc ϵ RII ⁻ , CD24 ⁺ , CD38 ⁺ , CD43 ⁻ , C1q R1/CD93 ⁺ , IgD ⁻ , IgM ⁺
Célula B1a	No se han descrito para humano	CD1d ^{mid} , CD38 ⁺ , CD5 ⁺ , CD19 ^{high} , CD23/Fc ϵ RII ⁻ , CD43 ⁺
Célula B1b	No se han descrito para humano	CD1d ^{mid} , CD38 ⁺ , CD5 ⁻ , CD19 ^{high} , CD23/Fc ϵ RII ⁻ , CD43 ⁺
Célula B transicional	CD10/Neprilysin ^{low} , CD5 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD21 ⁺ , CD23/Fc ϵ RII ⁺ , CD24 ⁺ , CD27 ⁻ , CD38 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , TACI ⁺	T1: B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁺ , CD24 ⁺ , CD43 ⁻ , C1q R1/CD93 ⁺ , IgM ⁺ , IgD ^{low} T2: B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁺ , CD24 ⁺ , CD43 ⁻ , CD38 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , IgM ⁺ , IgD ⁺
Célula B de zona marginal	CD1c ⁺ , CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD21 ⁺ , CD27 ⁺ , FCRL3/FcRH3 ⁺ , TACI ⁺	B220/CD45 R ⁺ , CD1d ⁺ , CD19 ^{mid} , CD21 ^{high} , CD23/Fc ϵ RII ⁻ , CD43 ⁻ , C1q R1/CD93 ⁻ , IgM ^{high} , IgD ^{low}
Célula B folicular	CD10/Neprilisina ⁻ , CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD21 ⁺ , CD22/Siglec-2 ⁺ , CD23/Fc ϵ RII ⁺ , CD24 ^{low} , CD27 ⁻ , CD38 ^{low} , CXCR5 ⁺ , TACI ⁺ , MHC class II ⁺	B220/CD45 R ⁺ , CD1d ^{mid} , CD19 ^{mid} , CD21 ^{low} , CD23/Fc ϵ RII ⁺ , CD43 ⁻ , CXCR5 ⁺ , IgM ^{low} , IgD ^{high}
Célula B de centro germinal activada	CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD27 ⁺ , CD38 ⁺ , CD40 ⁺ , CD83 ⁺ , TACI ⁺ , MHC class II ⁺	B220/CD45 R ⁺ , CD38 ⁺ , CD19 ⁺ , CD40 ⁺ , MHC class II ⁺
Célula B de memoria	CD19 ⁺ , CD20/MS4A1 ⁺ , CD21 ⁺ , CD27 ^{mid/+} , C1q R1/CD93 ⁻ , TACI ⁺	B220/CD45 R ⁺ , CD19 ⁺ , CD21 ⁺ , CD27 ^{mid/+} , CD40 ⁺ , MHC class II ⁺
Plasmablasto	BCMA ⁺ , CD19 ^{low} , CD27 ^{high} , CD38 ⁺ , C1q R1/CD93 ⁺ , Syndecan-1/CD138 ^{-/low}	B220/CD45 R ^{low} , CD19 ⁺ , CD27 ^{high} , CD38 ⁺ , Syndecan-1/CD138 ⁺
Célula Plasmática	BCMA ⁺ , BLIMP1 ⁺ , CD19 ^{low} , CD20/MS4A1 ^{-/low} , CD27 ^{high} , CD38 ^{high} , Syndecan-1/CD138 ⁺ , CXCR4 ⁺ , CD38 ⁺ , MHC class II ^{low}	B220/CD45 R ^{low} , BLIMP1 ⁺ , CD19 ⁻ , CD27 ^{high} , CD38 ^{low} , CXCR4 ^{high} , Syndecan-1/CD138 ⁺ , MHC class II ^{-/low}
Célula B reguladora	CD1d ⁺ , CD5 ⁺ , CD19 ⁺ , CD21 ⁺ , CD24 ⁺ , IL-10 ⁺ , IL-35 ⁺ , TGF- β ⁺	CD1d ⁺ , CD5 ⁺ , CD19 ⁺ , CD23/Fc ϵ RII ^{-/low} , CD24 ⁺ , C1qR1/CD93 ^{-/low} , TIM-1 ⁺ , IL-10 ⁺ , IL-35 ⁺ , TGF- β ⁺



TRENDS in Immunology

Figura 2. Expresión de CD38 en el desarrollo de los linfocitos B. La HSC, estimulada adecuadamente, da lugar a precursores inmaduros de linfocitos B en la BM, los cuales expresan bajos niveles del receptor CD38 en su superficie; posteriormente, estas células se diferencian en linfocitos B transicionales (primero T1 y después a T2) que junto con las células B inexpertas y las células B1 (que son estadios posteriores a las transicionales) expresan cantidades mayores de CD38 comparados con sus precursores. Finalmente estas células migran a centros germinales y terminan de diferenciarse en células B de memoria (sin CD38) y células plasmáticas que expresan cantidades bajas del receptor^{13,18}. Las cruces blancas representan la expresión relativa de CD38 en cada estadio celular.

El entrecruzamiento de CD38 con anticuerpos agonistas induce una cascada de señalización que resulta en proliferación, reducción o aumento de apoptosis, CSR, entre otros efectos. Los ratones deficientes poseen respuestas reguladas rio abajo contra antígenos T independientes y T dependientes, indicando que CD38 no es esencial para activar células B, pero posee, en combinación con otros receptores de señalización, una función regulatoria. La proliferación o sobrevivencia de células B está relacionada con la presencia o ausencia de CD38 ^{19,20}.

El modelo murino con ausencia de CD 38 presenta una ligera disminución de los títulos de anticuerpos sistémicos. A los 8 meses de edad, estos ratones muestran una disminución más pronunciada de anticuerpos en suero. Se ha observado que; a nivel sistémico, este modelo posee cantidades menores de células B transicionales 2 y maduras, y cantidades elevadas de células B transicionales 1 con respecto al ratón de fenotipo silvestre ²¹.

En humanos, se ha ligado la sobreexpresión de CD38 con leucemia linfocítica crónica, la disfunción de CD38 como receptor se ha asociado a mieloma múltiple y la ausencia de esta molécula de superficie se relaciona con leucemia promielocítica²². La mayoría de los estudios se han realizado a nivel sistémico; estudiar a CD38 en un sitio anatómico especializado como el intestino puede generar información que relacione a esta molécula con alteraciones en la respuesta inmunitaria local. A diferencia de la mayoría de los tejidos sanos, en condiciones basales, la lámina propia intestinal contiene células plasmáticas productoras de IgA ²³.

1.4 Tejido linfoide asociado a intestino (GALT)

Anatómicamente, el tracto gastrointestinal es similar en humanos y ratones. En ambas especies, la mayor parte del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) se encuentra localizado en el tracto gastrointestinal (GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissue*), en las placas de Peyer (PP, *Peyer's Patches*) a manera de cúmulos, como folículos linfoides aislados (ILFs, *Isolated Lymphoid Follicles*) y en el ganglio linfático mesentérico (MLN, *Mesenteric Lymph Node*), los cuales forman juntos al órgano linfoide de mayor tamaño en el cuerpo (Figura 3) ^{24,25}.

De manera anatómica y funcional, la respuesta inmunitaria en las mucosas puede dividirse en sitios inductores y efectores. Los sitios inductores son aquellos donde los antígenos muestreados de las superficies de la mucosa activan a los linfocitos T y B. Los sitios efectores, en los cuales las células efectoras, después de la activación, proliferación y diferenciación, realizan su acción, consisten en el epitelio y la LP donde los linfocitos están esparcidos por todo el tejido ²⁵, y siguen una organización definida ²⁶.

Los microorganismos son muestreados constantemente desde el lumen intestinal a sitios inductores del sistema inmunitario intestinal. Los primates han evolucionado junto con su microbiota intestinal, resultando en una situación de tolerancia microbiana. La barrera intestinal provee de manera combinada mecanismos de detección y defensa que logran protección en contra de microorganismos comensales y potencialmente patógenos ²⁷.

Las PP fueron nombradas por Johann Conrad Peyer, quien las describió en 1673 como “áreas elevadas compuestas de ganglios linfáticos en la membrana mucosa del intestino delgado”. Las PP poseen un alto contenido de vasos linfáticos que son usados como puerta de salida por linfocitos y células plasmáticas. Estas PP se encuentran continuamente expuestas a antígenos derivados de la mucosa y sus folículos contienen centros germinales, sitios de hipermutación somática (SHM, *Somatic Hyper Mutation*) del gen para inmunoglobulinas (Ig) y selección de células B. Muchas de las células B presentes dentro de las PP han experimentado un cambio de isotipo de IgM hacia IgA, y estas PP dan lugar a células plasmáticas IgA⁺, que son dirigidas selectivamente hacia la LP intestinal ^{28,29}.

Las PP son visibles macroscópicamente y son los tejidos mejor caracterizados del GALT, se encuentran localizadas del lado antimesentérico del intestino delgado. El tamaño y densidad de las PP incrementan desde el yeyuno al íleon; están particularmente concentradas en el íleon distal y son raras en el duodeno. Las PP consisten en numerosos folículos linfoides de células B, los cuales tienen áreas de células T flanqueándolos; las PP no son encapsuladas y contienen siempre centros germinales, lo cual es indicativo de una estimulación inmunitaria continua, comúnmente en respuesta a antígenos del lumen intestinal. El desarrollo de las PP se inicia durante la vida embrionaria y se completa después del nacimiento, en este desarrollo de las PP, ocurre una rápida segregación de células T y B ^{30,31}.

La entrada del antígeno a las PP ocurre de manera predominante por células M, estas células epiteliales son especializadas y se pueden asociar a antígenos bacterianos, virales, fúngicos, la toxina del cólera, la peroxidasa de rábano picante, complejos inmunes, priones y partículas inertes y transportarlos vía transcitosis ^{30,32}.

El GALT posee diversas poblaciones de células B. La característica principal del GALT en el intestino delgado y el apéndice son los GC prominentes, que contienen células B, las cuales han sido activadas. Las células B en los GC se encuentran rodeadas por otras células, como las células dendríticas foliculares, células T cooperadoras foliculares y macrófagos que apoyan la expansión y selección clonal de las células B en los GC ²⁹.

La protección inmunitaria de la mucosa intestinal humana depende de la secreción de IgA por las células plasmáticas que ocupan el tejido conectivo subepitelial difuso de la lámina propia intestinal. La inmunoglobulina A (IgA) polimérica secretada localmente se une con el receptor de Ig poliméricas (pIgR, *Polymeric Immunoglobulin Receptor*) y es transportada activamente al interior

del lumen intestinal donde regula las poblaciones bacterianas ^{33,34}. Las IgA presentes en el lumen intestinal (slgA, *Secretory Immunoglobulin A*) son transportadas a través de los enterocitos por el sistema inmunitario secretor de inmunoglobulinas poliméricas (PISIS, *Polymeric Immunoglobulin Secretory Immune System*) ^{34,35}.

Los anticuerpos intestinales juegan un papel importante en la neutralización de patógenos invasivos que entran por vía oral, dentro de éstos se incluyen virus y bacterias. La inmunoglobulina IgA, la cual es el isotipo principal de inmunoglobulina (Ig) en mucosas, también es el anticuerpo producido de manera más abundante en el cuerpo. La IgA es secretada en forma dimérica por células plasmáticas que se encuentran distribuidas a lo largo del intestino delgado, es transportada al lumen intestinal por el receptor de IgA polimérica. Las células productoras de IgA intestinal pueden ser de distintos orígenes, incluyendo células B de los ganglios linfáticos mesentéricos, bazo e ILFs, pero las PP son la principal fuente de estas células ^{30,36}.

Sirviendo como una barrera externa, la slgA tiene una función principal protegiendo las superficies mucosas en contra de la colonización y potencial invasión de microorganismos patógenos, a este mecanismo se le llama "exclusión inmune". Evidencia del requerimiento de la slgA en la protección contra bacterias ha sido obtenida de estudios acerca de la exclusión inmune de los patógenos bacterianos; estudios de inmunizaciones pasivas revelaron que slgA específica de antígeno tiene la capacidad de proteger células epiteliales de la invasión por bacterias patógenas como *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *Helicobacter felis* y *V. cholerae* ^{37,38}.

La exclusión inmune es el mecanismo mediante el cual la slgA impide que los microorganismos y las toxinas se adhieran a células epiteliales, previniendo el daño a la superficie, la colonización y la subsecuente invasión masiva. En el contexto intestinal, la exclusión inmune depende de la habilidad de la slgA para reconocer múltiples epítomos antigénicos en la superficie de virus y bacterias, así como proteínas, para unirse a estos antígenos en el lumen intestinal y, en consecuencia, abolir su potencial invasivo ³⁹. A la par de la exclusión inmune, el sistema inmunitario en el intestino tiene la capacidad de inducir tolerancia contra antígenos no perjudiciales en forma de una respuesta inmunosupresora. Este mecanismo tolerogénico previene el montaje de una respuesta inmunitaria activa o inflamación inapropiada contra antígenos dietarios inofensivos y la microbiota comensal. Un funcionamiento defectuoso de las respuestas tolerogénicas puede resultar en alergias a los alimentos, enfermedad celiaca o promover la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*). El mecanismo de las respuestas tolerogénicas incluye la anergia de células T antígeno específicas y la inhibición de las respuestas por células T reguladoras ^{25,40}.

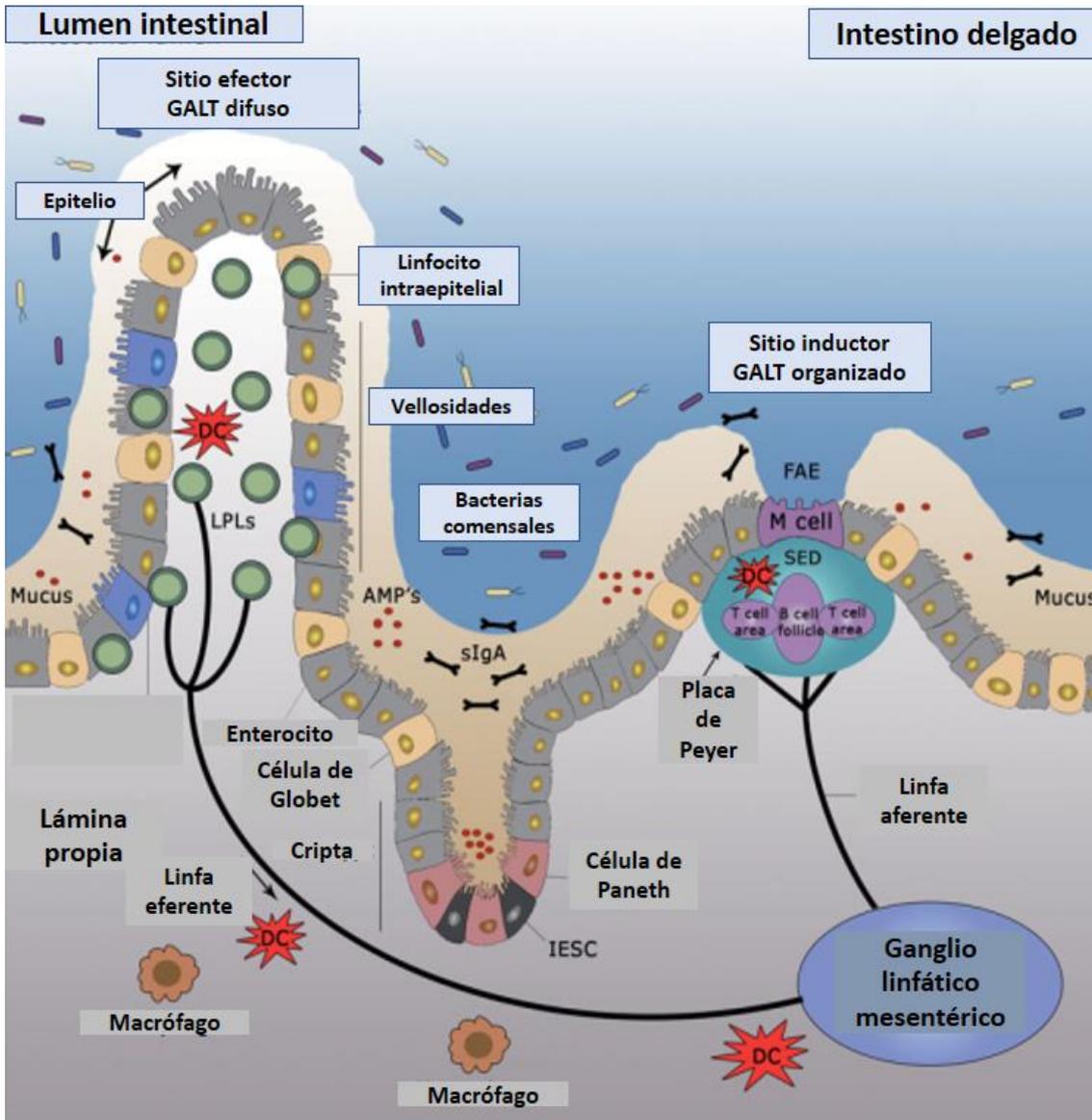


Figura 3. Sistema inmunitario del tracto gastrointestinal. Las células de epitelio intestinal y la capa mucosa forman una barrera física y bioquímica que mantiene la separación entre el lumen intestinal y el sistema inmunitario mucoso. El GALT consiste en tejidos linfoides organizados de las PP y los MLNs, que son los principales sitios de inducción de respuestas inmunitarias, mientras que la lámina propia y el estrato epitelial son considerados como sitios efectores. Las placas de Peyer y la lámina propia son, ambos, drenados por la linfa eferente que se dirige al MLN. En conjunto, la barrera epitelial, el tejido linfoide organizado, las células inmunitarias dispersas a lo largo de la lámina propia y el epitelio forman los componentes primarios del sistema inmunitario intestinal. FAE: epitelio asociado a folículo (*Follicle-Associated Epithelium*); MLN: ganglio linfático mesentérico (*Mesenteric Lymph Node*); M cell: célula microplegada; SED: domo subepitelial (*Subepitelial Dome*); DC: célula dendrítica (*Dendritic Cell*); AMP: Péptidos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides*), LPLs: Linfocitos de lámina propia (*LP Lymphocytes*); IESC: Células Madre de Epitelio Intestinal (*Intestinal Epithelial Stem Cells*)²⁵.

En el humano, las células B CD20⁺ son numerosas en las estructuras del GALT, y escasas en la lámina propia. Unas pocas y dispersas células B (CD20⁺, CD27⁺, MHCII⁺), principalmente productoras de IgA pueden observarse en secciones de tejido procedente de yeyuno. Células B efectoras del linaje secretor de anticuerpos (como células plasmáticas y plasmablastos) poseen una distribución casi exclusiva en la lámina propia del intestino. IgA es por mucho el isotipo dominante producido por estas células tanto en duodeno como en yeyuno ²⁹.

A manera de resumen, se ha observado que CD38 induce la proliferación de linfocitos B maduros, dirige el cambio de isotipo hacia IgG1 y su activación como receptor en linfocitos B inmaduros conduce a estos hacia apoptosis; también es un receptor que entrecruza con las vías de señalización del BCR e IgM. Se tienen datos de que existe una expresión de CD38 importante en la cavidad peritoneal y en las placas de Peyer, sitios poco estudiados para esta molécula; dado que diferentes receptores poseen funciones potenciadas, disminuidas o diferentes dependiendo del sitio anatómico y de la población celular en la que se encuentren expresados, resulta importante investigar si la ausencia de CD38 en el tejido linfoide asociado a intestino provoca alteraciones en la homeostasis de éste con consecuencias en su función.

2. Justificación

Una de las moléculas implicadas en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células productoras de anticuerpos es CD38. Los anticuerpos secretados al lumen del intestino delgado, así como las células que los producen en el sitio, son críticos para los efectos de protección y de exclusión inmune.

Por lo anterior, resulta importante estudiar las consecuencias biológicas de la ausencia de CD38 en el tejido linfoide asociado a intestino delgado en un modelo murino.

3. Hipótesis

La ausencia de CD38 afecta las cantidades de anticuerpos y las proporciones y números absolutos de las subpoblaciones de linfocitos B en el tejido linfoide asociado a intestino del modelo murino.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de la ausencia de CD38 en la cantidad de anticuerpos del lumen intestinal y en las subpoblaciones de linfocitos B en el tejido linfoide asociado a intestino del modelo murino.

4.2 Objetivos particulares:

- Cuantificar los niveles de anticuerpos totales en el suero y en lavado del lumen intestinal de ratones CD38^{-/-} comparados contra ratones silvestres.
- Comparar las proporciones y números absolutos de las subpoblaciones de linfocitos B en lámina propia, placas de Peyer y cavidad peritoneal de ratones CD38^{-/-} contra ratones silvestres.

5. Materiales y Métodos

5.1 Diseño experimental

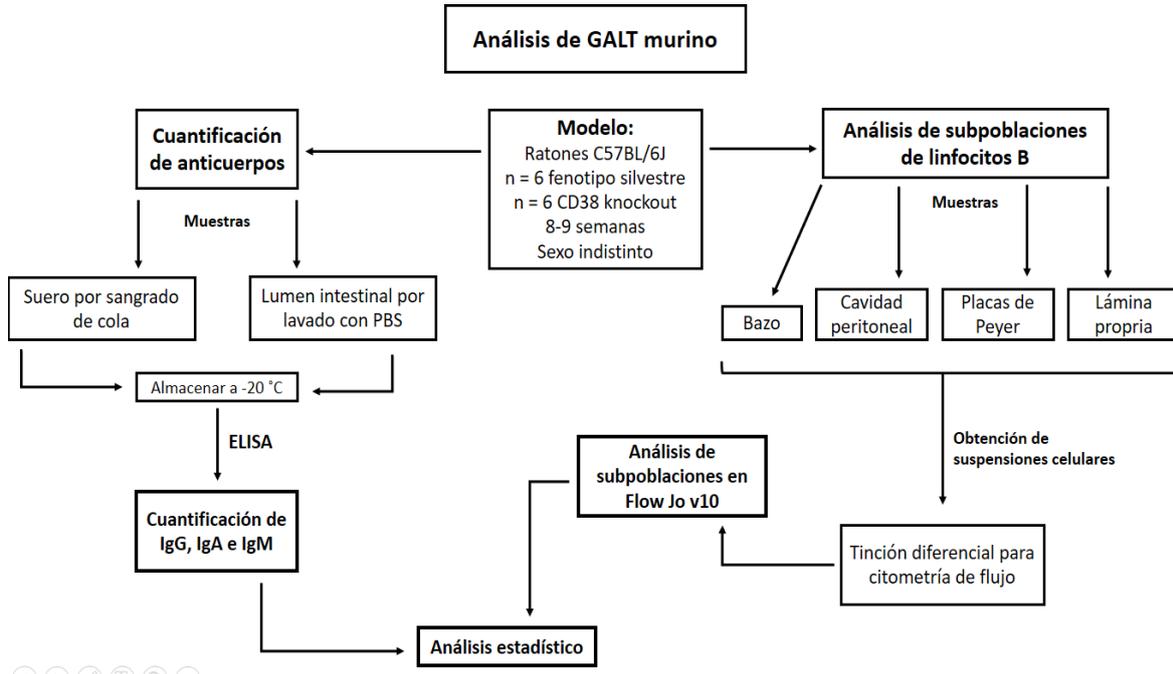


Figura 4. Esquema general de toma de muestras y procedimiento experimental.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J CD38^{-/-} y silvestres de 10 a 12 semanas de edad. Las placas de poliestireno para ELISA fueron sensibilizadas con anticuerpos α -inmunoglobulinas totales de ratón y reveladas con anticuerpos α -IgA, α -IgG y α -IgM de ratón acoplados a biotina en pozos separados. Las tinciones para citometría se realizaron con anticuerpos α -CD3 (FITC), α -B220 (Brilliant violet), α -CD5 (PE), α -CD23 (PE-Cy7) y α -CD38 (APC).

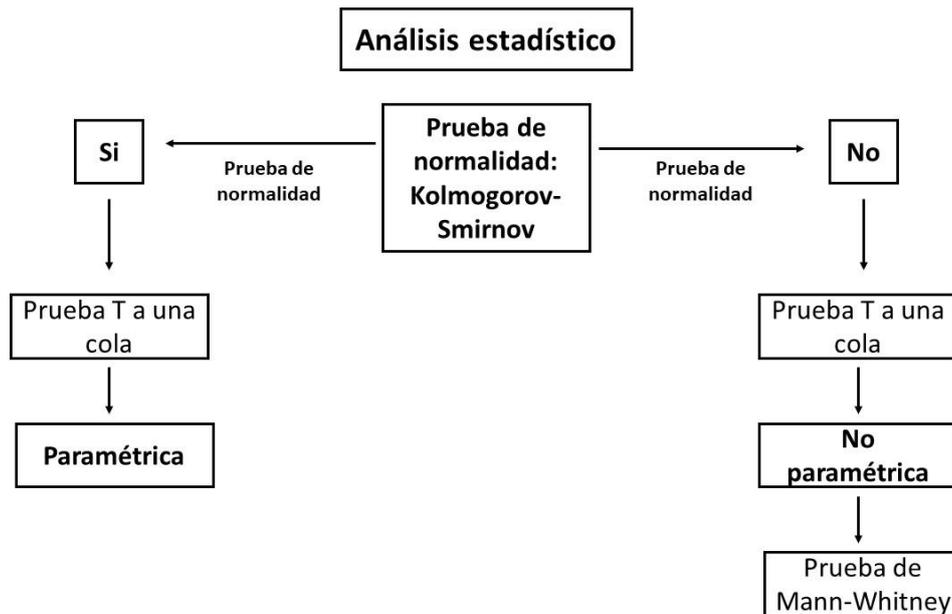


Figura 5. Esquema general para el análisis estadístico. Se utilizó prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov para cada serie de datos arrojada por los grupos de ratones de fenotipo silvestre contra CD38^{-/-}. En los grupos de distribución normal, se realizó estadística con prueba paramétrica de T de Student a una sola cola. Aquellos datos que no pasaron la prueba de normalidad fueron sometidos a una prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

5.2 Animales

Se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6J y B6.129P2-Cd38^{tm1Lnd}/J de 8 a 9 semanas de edad y mantenidos en el bioterio del *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados* (CINVESTAV) en condiciones libres de patógenos específicos (SPF, Specific Pathogen Free). Se utilizaron 6 ratones de fenotipo silvestre y 6 del fenotipo CD38^{-/-} para los experimentos de ELISA y 6 ratones de fenotipo silvestre y 6 del fenotipo CD38^{-/-} para los experimentos de citometría de flujo. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

5.3 Pruebas de ELISA

5.3.1 Muestras

- 1) Toma de muestra sanguínea por sangrado de cola: Se colocó al animal en un recipiente de vidrio de aprox. 1 L de capacidad, cuya tapa se encuentra acoplada a un foco de luz roja incandescente de 100 W. Se encendió el foco y en cuanto el animal comenzó a hiperventilar (aprox. 10 min), se retiró a éste del frasco y fue inmovilizado en un sujetador de plástico para ratones, la cola del ratón fue seccionada en la parte proximal a su cavidad rectal de manera transversal con una navaja para rasurar y las gotas fueron recuperadas en microtubos para centrifuga de 1.5 mL previamente membretados, por este método se pudieron obtener de 450

- a 700 μL y se comprobó que la muestra tenía menor grado de lisis que por el método de punción cardíaca.
- 2) Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron a 250 g por 3 minutos y el suero se recuperó con ayuda de pipetas semiautomáticas hacia otros microtubos para centrifuga de 1.5 mL previamente membretados. El suero obtenido se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizado para ensayos de ELISA.
 - 3) Posteriormente, se sacrificó al animal por dislocación cervical.
 - 4) Se colocó al ratón sobre su dorso en una superficie de trabajo, este fue sujetado de sus extremidades con ayuda de agujas de jeringa de 27 G y rociado con abundante etanol al 70 % para esterilizar y evitar que el pelaje del animal interfiera con la obtención de muestras.
 - 5) La piel del mesogastrio y la barrera peritoneal fueron escindidas, exponiendo los órganos internos; se extrajo el intestino delgado seccionándolo desde el duodeno (adherido al estómago) hasta el íleon (adherido al colon) y este fue colocado en una caja de Petri, manteniendo al tejido húmedo en todo momento con PBS frío.
 - 6) El intestino delgado se pesó y se midió.
 - 7) Se ató el intestino delgado por ambos extremos con hilo de algodón.
 - 8) Se inyectaron 100 μL de PBS frío por cada centímetro de longitud (1 mL por cada centímetro (cm) de intestino.
 - 9) El líquido del lavado se recuperó y se colocó en un microtubo para centrifuga de 2 mL.
 - 10) El lavado intestinal obtenido se centrifugó en las siguientes condiciones: 700 g por 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - 11) Se recuperó el sobrenadante y se le añadieron inhibidores de proteasas (TPCK 97 %, TLCK 96 % y PMSF 98 %) a razón de 5 μL de solución inhibidora de proteasas por cada 100 μL de muestra.
 - 12) Las muestras obtenidas se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.3.2 Procedimiento

- 13) Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos con fondo redondo (*Thermo fisher scientific USA Lote 17117012*) con el anticuerpo policlonal cabra anti-ratón IgG + IgA + IgM (H+L) (*Invitrogen PA1-85986*), con 100 μL por pozo a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (diluido en solución tampón de carbonatos). Tiempo de incubación 8-12 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 14) Una vez sensibilizadas se les realizaron 40 lavados con 300 μL por pozo de solución Tween-20 al 0.075%. (solución general trizma base + NaCl).
- 15) Las placas se bloquearon con 300 μL por pozo con BSA al 1 % en solución de lavado para IgG, IgA e IgM. Tiempo de incubación 1 h a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, en agitación (150 rpm).
- 16) Posterior al bloqueo se realizaron 40 lavados con 300 μL por pozo de solución Tween-20 al 0.075% (solución general trizma base + NaCl).
- 17) Curva estándar: Se preparó utilizando un suero de referencia de ratón (*Bethyl*) lote *RS10-101-6* que contiene concentraciones conocidas de

- IgG, IgA e IgM murinas a una concentración inicial de 250 ng/mL en diluciones decrecientes doble seriadas (100 µL por pozo).
- Muestras: Suero o lavado de lumen de intestino delgado murino se adicionaron a razón de 100 µL por pozo en diluciones dobles seriadas. Tiempo de incubación 1 h a 24 °C, en agitación (150 rpm).
- 18) Se realizaron 40 lavados con 300 µL por pozo de solución tween-20 al 0.075% (solución general trizma base + NaCl).
 - 19) Se adicionaron los anticuerpos anti-isotipo específicos biotinilado (diluidos en solución tampón de dilución), 100 µL por pozo. Tiempo de incubación 1 h a 24 °C, en agitación (150 rpm):
 - a) Para la detección de IgG en suero o lavado de intestino delgado de ratón: Se utilizó el fragmento Fcγ conjugado a biotina de un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón (*Jackson Research Laboratories 315-065-008*) (dil: 1:400,000).
 - b) Para la detección de IgA en suero o lavado de intestino delgado de ratón: Se utilizó un anticuerpo policlonal cabra anti-cadena alfa de IgA de ratón conjugado a biotina (*Abcam ab97233*) (dil: 1:80,000).
 - c) Para la detección de IgM en suero o lavado de intestino delgado de ratón: Se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-cadena µ murina de la IgM acoplado a biotina en su región Fc (*Jackson Research Laboratories 315-065-020*) (dil: 1:200,000).
 - 20) Se realizaron 40 lavados con 300 µL por pozo de solución tween-20 al 0.075% (solución general trizma base + NaCl).
 - 21) El complejo estreptavidina – HRP se adicionó a razón de 100 µL por pozo. Dil: 1:5,000 (solución tampón de dilución). Tiempo de incubación 1 h a 24 °C, en agitación (150 rpm).
 - 22) Se realizaron 40 lavados con 300 µL por pozo de solución Tween-20 al 0.075% (solución general trizma base + NaCl).
 - 23) Las placas se revelaron con TMB con H₂O₂ (en solución tampón de citratos) tiempo de incubación 5-10 min o hasta que la mayor señal llegó a 0.5 en 650 nm. La reacción se detiene con H₂SO₄ 0.2 M, y se lee a 450 nm.
 - 24) Los datos se analizaron por la prueba T Student a una sola cola con el software GraphPad v7.

5.3.3 Soluciones para ELISA

- 1) Solución tampón de carbonatos pH 9.6 50 mM:
- 2) Solución A: Solución de carbonato disódico 0.5 M Na₂CO₃ PM: 105.99, pesar 2.64 g, disolver en agua destilada y aforar a 50 mL.
- 3) Solución B: Solución de bicarbonato de sodio 0.5 M NaHCO₃ PM: 84.01, pesar 2.1 g, disolver en agua destilada y aforar a 50 mL.
- 4) Mezclar 2.5 mL sol. A + 7.5 mL sol. B, ajustar pH y aforar a 100 mL.
- 5) Solución general: Trizma base 50 mM 60.57 g + NaCl 0.14 M 81.8 g. Aforar a un litro, solución 10x.
- 6) Solución de bloqueo: 30 mL por placa de solución general 1x al 1% de BSA.
- 7) Solución de lavado: 4 L de solución general 1x al 0.075% de Tween-20.

- 8) Solución tampón de dilución: Solución de lavado al 1% de BSA (10 mL por placa).
- 9) Solución de TMB en tampón de citratos: 1 mL de TMB disuelto en DMSO + 10 mL de solución tampón de citratos + 2 μ L H₂O₂.
- 10) Solución tampón de citratos pH 5.0: Citrato de sodio 2.9 g + ácido cítrico 0.41 g, ajustar pH y aforar con agua destilada a 100 mL.

5.4 Ensayos de citometría de flujo

5.4.1 Muestras

5.4.1.1 Lavado de cavidad peritoneal

- 1) El ratón se sacrificó por dislocación cervical.
- 2) El animal se colocó y fijó en una superficie óptima para su manejo.
- 3) Se escindió la piel del mesogastrio, con cuidado de no dañar la barrera peritoneal.
- 4) Se inyectaron 9 mL de PBS frío y 1 mL de aire en el peritoneo con aguja de 27 G acoplada a una jeringa de 10 mL.
- 5) Se procedió a dar un ligero masaje de la barrera peritoneal del ratón de manera firme, suave y repetitiva por al menos 15 seg.
- 6) El líquido de la cavidad peritoneal se extrajo con aguja de 25 G y la suspensión celular obtenida se decantó lentamente sobre las paredes de un tubo para centrifuga de 15 mL.
- 7) El tubo con la suspensión celular se mantuvo en hielo hasta su uso.

5.4.1.2 Placas de Peyer

- 8) La barrera peritoneal fue escindida con el fin de exponer los órganos internos.
- 9) Se localizó el ciego y el estómago, para tomar el intestino delgado adyacente a éste y seccionar de ambos extremos. La medida del largo del intestino fue registrada.
- 10) El intestino se colocó sobre papel absorbente (el cual proporciona soporte y retira la grasa del mesenterio que pudiese estar adherida).
- 11) Se realizó un lavado del lumen intestinal con PBS frío (aprox. 3 mL).
- 12) Se localizaron las placas de Peyer en la cara antimesentérica del intestino (de 3 a 12 por ratón) y se seccionaron (con tijeras curvas), y se colocaron en una caja de Petri con aproximadamente 10 mL de PBS frío.
- 13) El resto del intestino se colocó en PBS frío hasta su uso.
- 14) Maceración de placas de Peyer: Se colocaron las placas de Peyer sobre una malla de plástico y se rasgaron tenuemente con agujas de 27 G, posteriormente fueron presionadas con la parte trasera de un émbolo de jeringa en la caja de Petri que contiene PBS frío para extraer el contenido celular.
- 15) La suspensión celular se recuperó con una jeringa de 5 mL sin aguja y ésta fue vertida gentilmente en un tubo para centrifuga de 15 mL.
- 16) Se mantuvo al tubo con la suspensión celular en hielo hasta su uso.

5.4.1.3 Lámina propia

- 17) Del intestino colocado en PBS frío, se realizaron cortes transversales de 2 a 4 cm entre cada uno y a estos fragmentos a su vez se les realizaron cortes longitudinales.
- 18) Se realizaron dos lavados a los fragmentos intestinales con solución de desprendimiento (30 mL HBSS sin Ca ni Mg + 60 μ L EDTA 0.5 M + 90 μ L DTT) en matraz de teflón por 30 min a 37°C en agitación. Posterior a cada lavado, se enjuagó con PBS entre cada uno y se recuperó el tejido de intestino, la suspensión celular se desechó (contiene IEL y células epiteliales).
- 19) El tejido se lavó dos veces con solución de digestión (25 mL HBSS + 35 mg Colagenasa II + 12.5 mg de dispasa) en matraz de teflón por 40 min a 37°C en agitación y se recuperó la suspensión celular lavando con PBS y centrifugando a 700 g por 5 min a 4°C. De considerar necesario se realizó un lavado adicional de la suspensión celular total filtrando, centrifugando en las condiciones mencionadas y resuspendiendo en un volumen de 3 mL de HBSS completo.
- 20) Se resuspendió la pastilla en aprox. 3 mL de PBS frío y la suspensión celular se conservó en hielo hasta su uso.

5.4.1.3 Bazo

- 21) Justo después de extraer el intestino, se extrajo el bazo y se colocó en una caja de Petri con PBS frío hasta su uso. Este órgano se extrajo para los controles de la tinción para citometría de flujo.
- 22) En una caja de Petri se vertieron aprox. 10 mL de PBS frío, sobre ésta, se colocó una malla metálica.
- 23) Se cortaron, sin seccionar, los extremos del órgano y fue presionado sobre la malla con la parte trasera de un émbolo de jeringa hasta que el tejido adquirió un aspecto blanquecino.
- 24) La suspensión celular se recuperó (cuidando que no existieran restos de tejido en ésta) con una jeringa de 10 mL (sin aguja).
- 25) Se guardó la suspensión celular en hielo hasta su uso.

5.4.2 Procesamiento de las suspensiones celulares para citometría de flujo

- 26) Se centrifugaron las suspensiones celulares a 700 g por 5 min a 4 °C. La suspensión celular procedente de la maceración de bazo se trató con solución de lisis para eritrocitos (cloruro de amonio) por 3 min.
- 27) Seguidamente, se decantaron los sobrenadantes y las pastillas se resuspendieron en PBS (para cavidad peritoneal y placas de Peyer 2 mL, para bazo 10 mL y en 3 mL para lámina propia).
- 28) Las células en suspensión se tiñeron con solución de trabajo de azul de tripano a razón 1:1 con las suspensiones celulares, posteriormente se contaron y se calculó la viabilidad celular mediante el uso de un contador automático.

- 29) De cada suspensión celular, se alicuotó el volumen necesario para un millón de células vivas en tubos para citometría previamente rotulados con el tipo de muestra y su respectiva tinción.
- 30) Los tubos se centrifugaron a 700 g por 5 min a 6 - 8 °C y se decantaron los sobrenadantes.
- 31) Se adicionaron 0.3 µL de anticuerpo acorde con el marcaje de los tubos individuales para controles y ajuste de parámetros en el equipo o en conjunto para los tubos problema. Se utilizaron anticuerpos anti-CD38 de ratón acoplado a APC (102711), anti-CD45R/B220 de ratón/humano acoplado a Violeta Brillante 421 (103239), anti-CD23 de ratón acoplado a PECy7 (101613), anti-CD3ε de ratón acoplado a FITC (100305) y anti-CD5 de ratón acoplado a PE (100607) (Biolegend, San Diego, CA 92121).
- 32) Los tubos anteriores se agitaron ligeramente y se incubaron por 20 min en hielo y protegidos de la luz.
- 33) Las suspensiones celulares ya teñidas se lavaron con 1 mL de BSA al 1 % en PBS, y se centrifugaron a 700 g por 5 min a 4 °C.
- 34) Después del lavado, las pastillas se resuspendieron en 350 - 500 µL de solución fijadora y se guardaron cubiertas de la luz a 4 °C hasta su lectura en el citómetro de flujo.

5.4.3 Lectura en el citómetro de flujo

- 35) Las muestras se transportaron en hielo cubiertas de la luz.
- 36) Antes de la lectura, se revisaron los tanques de agua y de desechos del citómetro de flujo, en caso de ser necesario, se vaciaron o llenaron según correspondía.
- 37) Al iniciar la lectura se limpió el sistema de flujo del equipo y se abrieron las gráficas necesarias para el monitoreo de los eventos en flujo.
- 38) Al finalizar la lectura los datos se guardaron en formato FACS 3.0.
- 39) Estos datos se analizaron con el software FlowJo v10.
- 40) A los datos obtenidos se les aplicó prueba estadística T de Student a una sola cola.

6. Resultados

6.1 La ausencia de CD38 no afecta las concentraciones de inmunoglobulinas séricas

En la figura 6 se muestran las concentraciones de anticuerpos séricos de ratones CD38^{-/-} comparados contra ratones de fenotipo silvestre. Se compararon cuantitativamente anticuerpos de clase IgG, IgA e IgM. No se encontró diferencia estadística significativa en las comparaciones de ratones CD38^{-/-} contra ratones de fenotipo silvestre. Las concentraciones se muestran en µg / mL. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

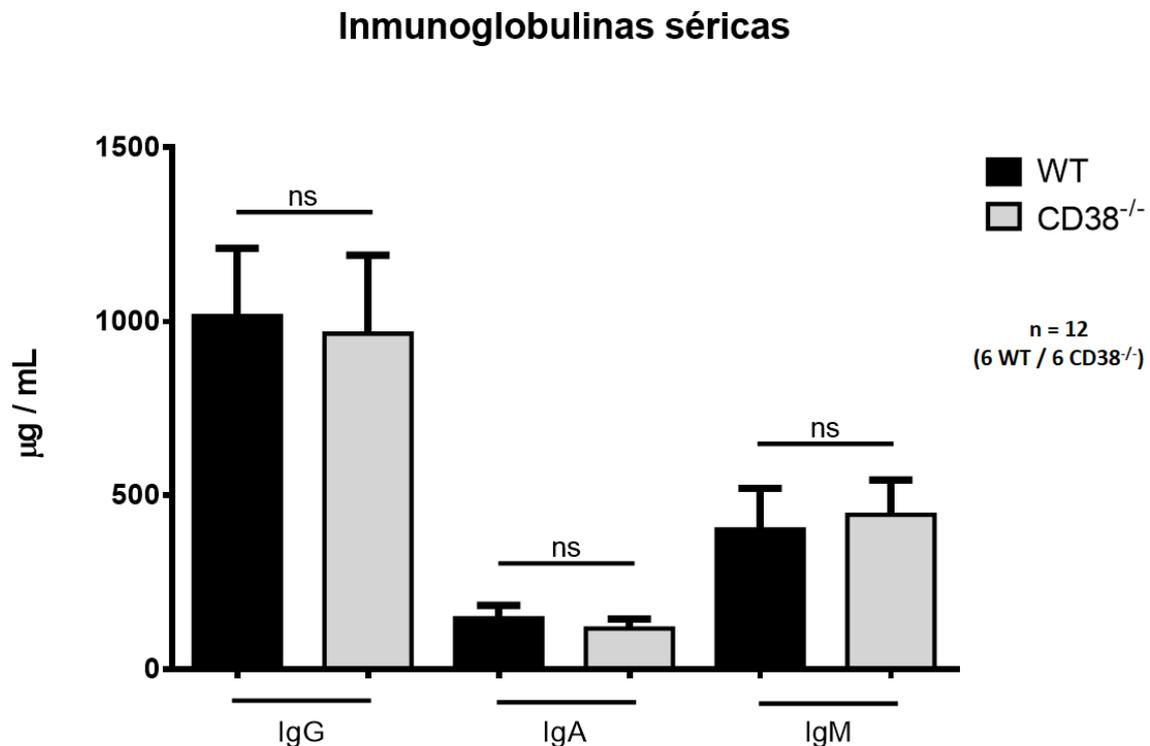


Figura 6. Cuantificación de IgG, IgA e IgM totales en suero de ratón. Las barras negras corresponden a los datos de ratones de fenotipo silvestre y las grises a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de barras para IgG: media IgG WT 872.4 µg / mL, media IgG CD38^{-/-} 811.4 µg / mL. Para IgA: media IgA WT 126.4 µg / mL, media IgA CD38 KO 91.35 µg / mL. Para IgM: media IgM WT 328.8 µg / mL, media IgM CD38^{-/-} 424.3 µg / mL. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.2 Los ratones CD38^{-/-} presentan concentraciones alteradas de anticuerpos IgA e IgM en el lumen intestinal comparados contra el fenotipo silvestre

En la figura 7 se muestran las concentraciones de anticuerpos del lumen del intestino delgado de ratones CD38^{-/-} comparados contra ratones de fenotipo silvestre. Se comparó cuantitativamente anticuerpos de clase IgG, IgA e IgM. Se observó un decremento estadísticamente significativo en las concentraciones de

anticuerpos de clase IgA de ratones CD38^{-/-} contra ratones de fenotipo silvestre. También se observa un incremento estadísticamente significativo en las concentraciones de anticuerpos de clase IgM de ratones CD38^{-/-} contra ratones de fenotipo silvestre. Las concentraciones se muestran en µg / mL. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

Inmunoglobulinas en contenido intestinal

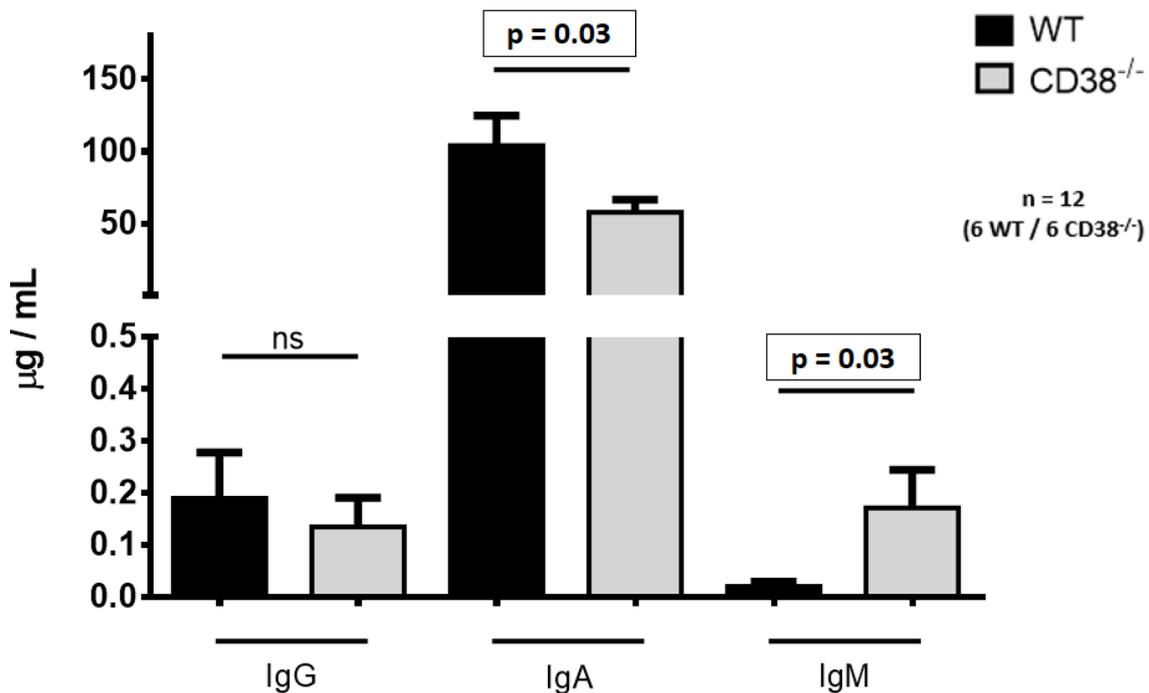


Figura 7. Cuantificación de IgG, IgA e IgM totales en lumen de intestino delgado de ratón. Las barras negras corresponden a los datos de ratones de fenotipo silvestre y las grises a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de barras para IgG: media IgG WT 0.074 µg / mL, media IgG CD38^{-/-} 0.089 µg / mL. Para IgA: media IgA WT 100.2 µg / mL, media IgA CD38^{-/-} 54.4 µg / mL. Para IgM: media IgM WT 0.013 µg / mL, media IgM CD38 KO 0.115 µg / mL. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.3 Rendimiento de poblaciones celulares totales en bazo, cavidad peritoneal, placas de Peyer y lámina propia

Con el fin de obtener números absolutos de las subpoblaciones de linfocitos B a analizar en este proyecto, los órganos extraídos fueron pesados (o medidos) obteniendo así un parámetro comparativo entre los ratones silvestres y CD38^{-/-}. En la figura 8 se muestran los rendimientos de células totales de bazo con base en el peso del órgano. En la figura 9 se muestran los rendimientos de células totales de cavidad peritoneal con base en el peso del animal. En la figura 10 se muestran los rendimientos de células totales de placas de Peyer con base en el peso del total de placas obtenidas por ratón. Finalmente, en la figura 11 se

presentan los rendimientos de células totales de lámina propia de intestino delgado con base en el peso del órgano sin placas de Peyer y con base en la longitud del mismo. El peso de los órganos se muestra expresado en gramos (g). Los números absolutos se muestran en células / mg. La longitud intestinal se muestra expresada en centímetros (cm). Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

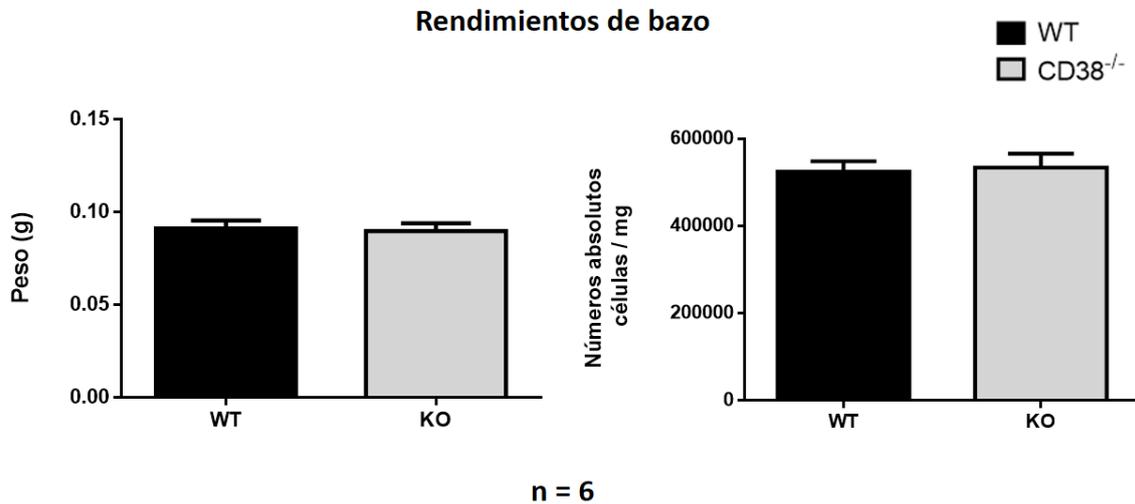


Figura 8. Rendimientos celulares de bazo. Las barras negras corresponden a los datos de ratones de fenotipo silvestre y las grises a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de barras para peso del bazo de ratones: media peso bazo WT 0.0945 g, media peso bazo CD38^{-/-} 0.0925 g. Números absolutos de células: media WT 521,445 células / mg, media CD38^{-/-} 557,487 células / mg. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

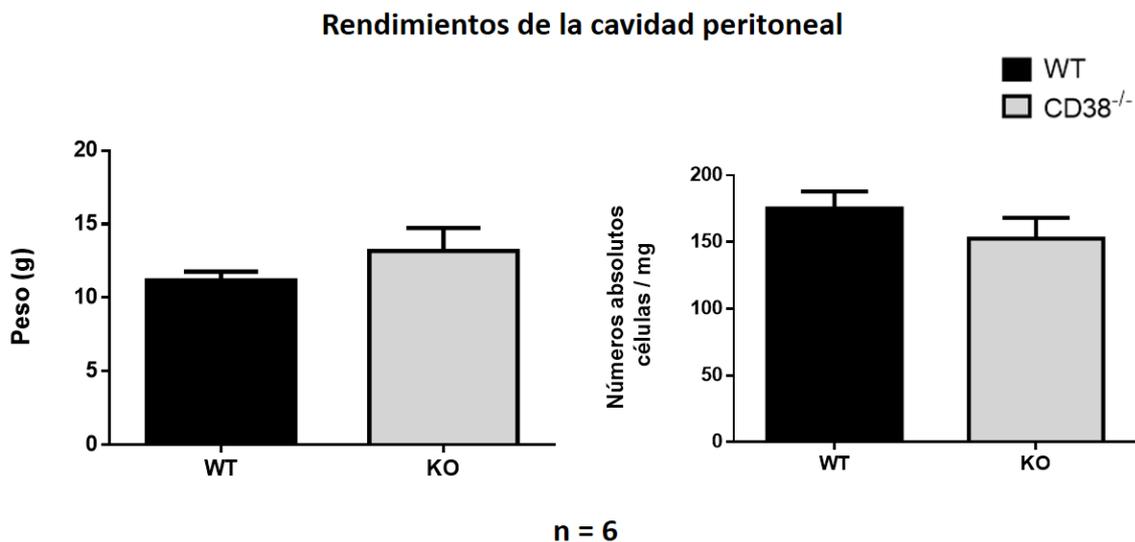
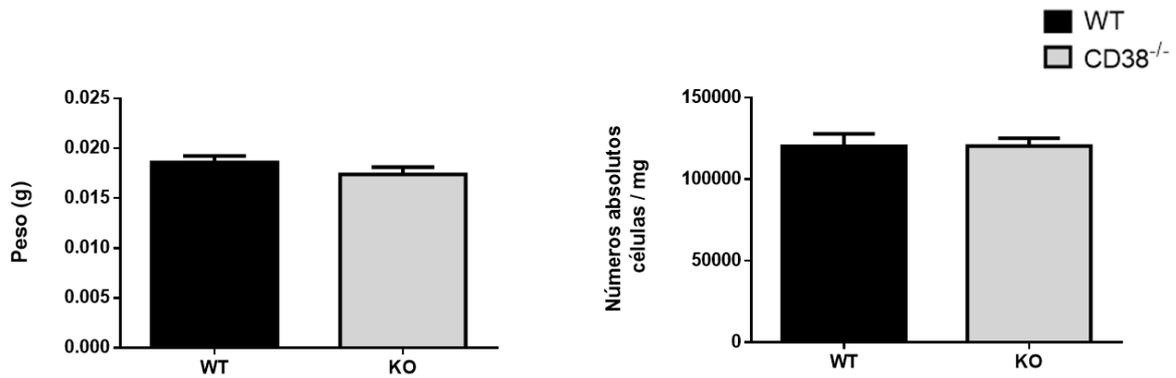


Figura 9. Rendimientos celulares de cavidad peritoneal. Las barras negras corresponden a los datos de ratones de fenotipo silvestre y las grises a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de barras para peso del total de los ratones: media peso ratón WT 11.5 g, media peso ratón CD38^{-/-} 13.25 g. Números absolutos de células: media WT 180.9 células / mg, media CD38^{-/-} 139.4 células / mg. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

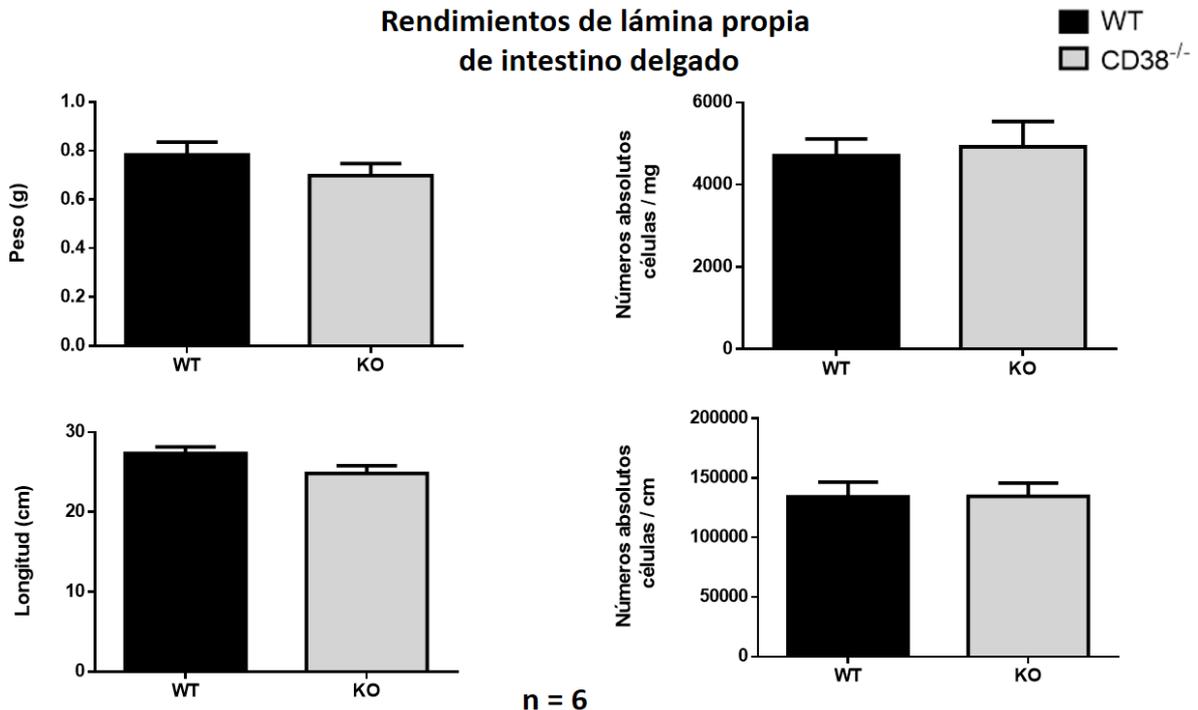
Rendimientos de las placas de Peyer



n = 6

Figura 10. Rendimientos celulares de placas de Peyer. Las barras negras corresponden a los datos de ratones de fenotipo silvestre y las grises a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de barras para peso de las placas de Peyer de ratones: media peso placas de Peyer WT 0.019 g, media peso bazo CD38^{-/-} 0.017 g. Números absolutos de células: media WT 112,598 células / mg, media CD38^{-/-} 117,079 células / mg. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

Rendimientos de lámina propia de intestino delgado



n = 6

Figura 11. Rendimientos celulares de lámina propia de intestino delgado. Las barras negras corresponden a los datos de ratones de fenotipo silvestre y las grises a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de barras para peso de la lámina propia (LP) de ratones: media peso LP WT 0.7715 g, media peso LP CD38^{-/-} 0.6441 g. Números absolutos de células: media WT 4,411 células / mg, media CD38^{-/-} 4,512 células / mg. En el gráfico de barras para longitud de la lámina propia (LP) de ratones: media longitud LP WT 27.75 cm, media longitud LP CD38^{-/-} 24.5 cm. Números absolutos de células: media WT 131,466 células / cm, media CD38^{-/-} 132,921 células / cm. Prueba estadística

T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.4 Análisis de poblaciones linfocitarias

En las Figuras 12 – 15 se presenta la estrategia de selección de poblaciones en el análisis por citometría de flujo de las suspensiones celulares obtenidas para bazo, cavidad peritoneal, PP y LP. Los fluorocromos utilizados fueron: FITC-CD3, violeta brillante 450-B220, PE-Cy7-CD23 y PE-CD5. La primer selección de poblaciones se realizó para granularidad enfrentando área contra altura; esto permite limpiar a la población de detritus celulares. La segunda selección se realizó para tamaño enfrentando área contra altura; permitiendo limpiar a la población de dobletes, la tercer gráfica se obtuvo al enfrentar granularidad contra tamaño y de esta población dependiendo el órgano, se seleccionó la población de mononucleares. Esta población se seleccionó para analizar linfocitos T y B utilizando CD3 y B220; una vez seleccionados los linfocitos B (B220⁺), a éstos se les analizó para determinar la presencia de CD23 y CD5, que permite separar a las subpoblaciones de células B, siendo estas: linfocitos B1a (CD5⁺, CD23⁻), linfocitos B1b (CD5⁻, CD23⁻) y linfocitos B2 (CD5⁻, CD23⁺).

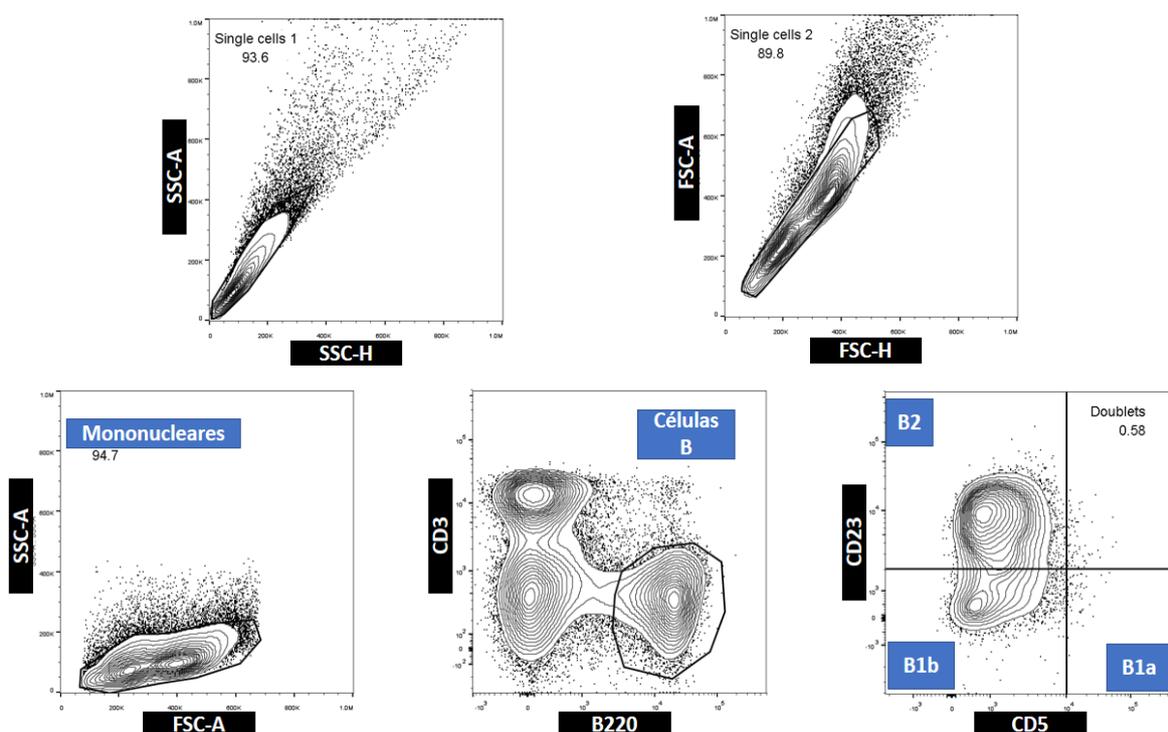


Figura 12. Selección de poblaciones de bazo. Esquema representativo del análisis de subpoblaciones de linfocitos B de bazo. Los datos corresponden a un ratón de fenotipo silvestre. El análisis se realizó con el software FlowJo v10, utilizando gráficas de contorno que muestran eventos individuales.

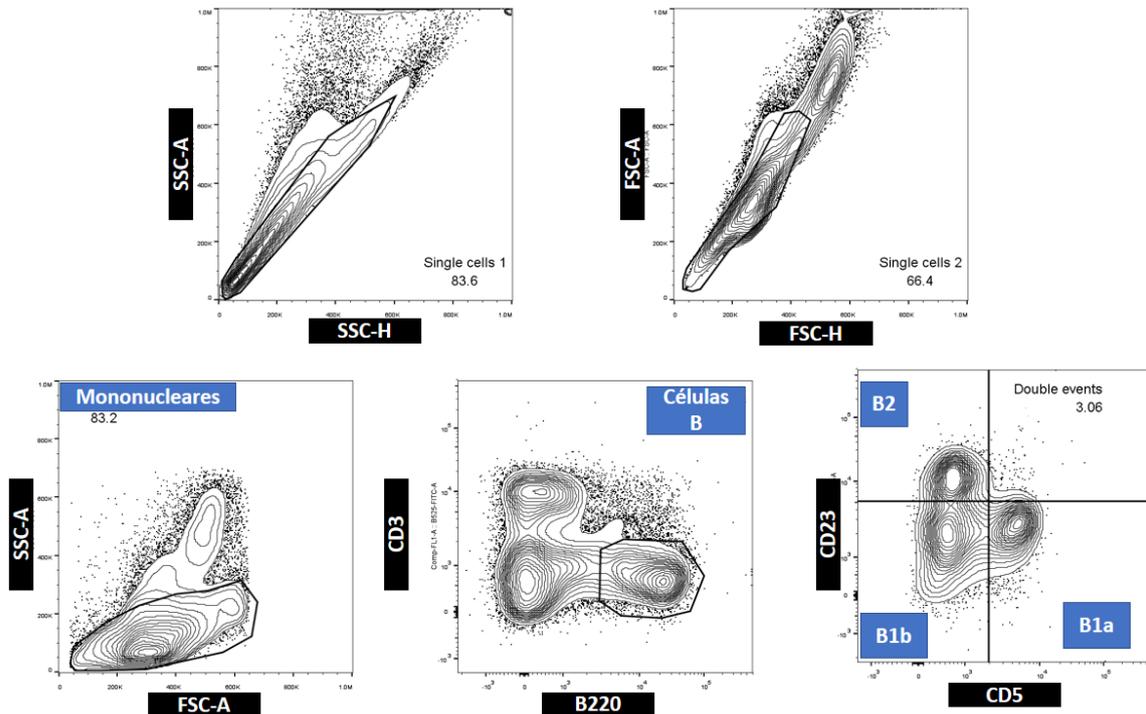


Figura 13. Selección de poblaciones de cavidad peritoneal. Esquema representativo del análisis de subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal. Los datos corresponden a un ratón de fenotipo silvestre. El análisis se realizó con el software FlowJo v10, utilizando gráficas de contorno que muestran eventos individuales.

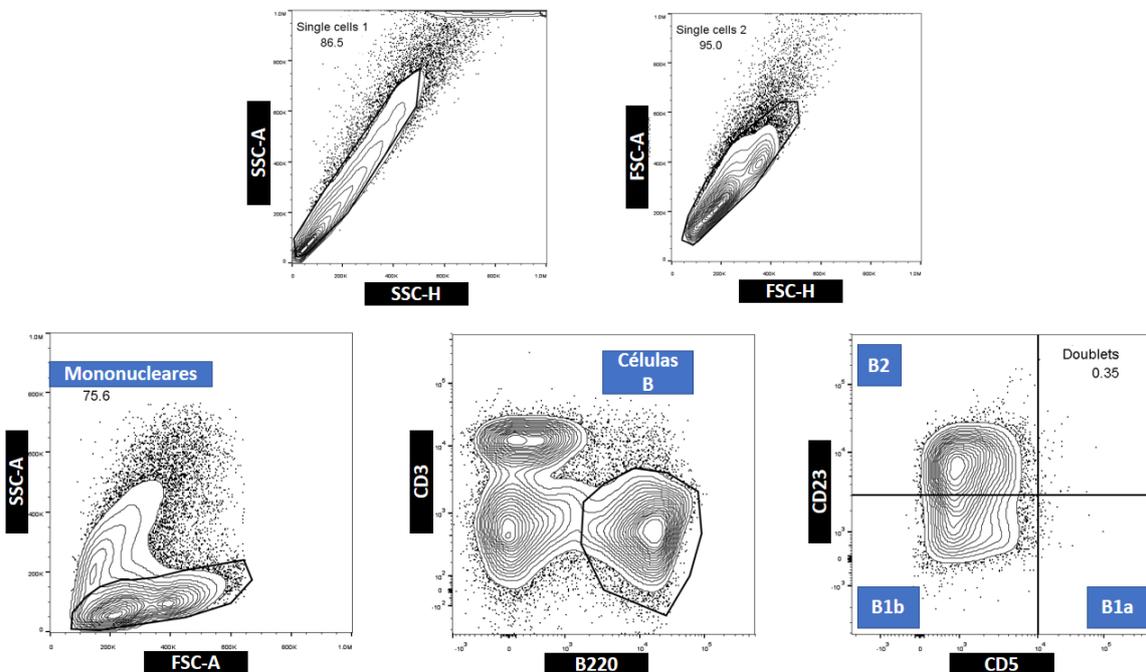


Figura 14. Selección de poblaciones de placas de Peyer. Esquema representativo del análisis de subpoblaciones de linfocitos B de PP. Los datos corresponden a un ratón de fenotipo silvestre. El análisis se realizó con el software FlowJo v10, utilizando gráficas de contorno que muestran eventos individuales.

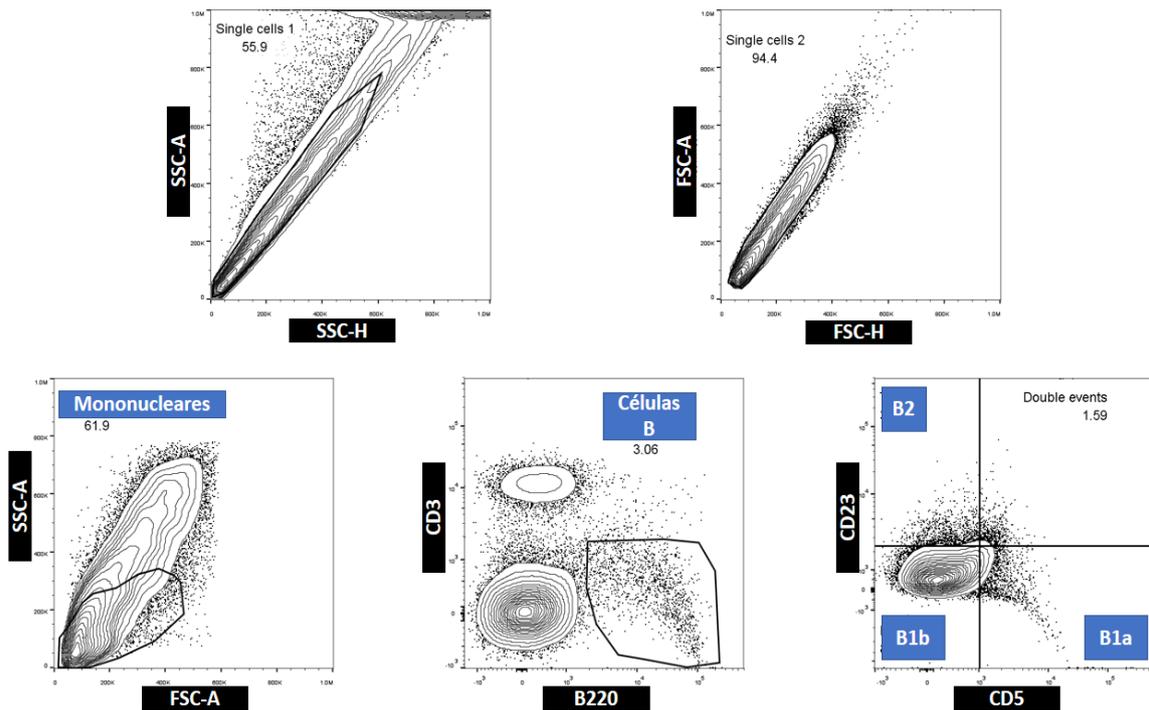


Figura 15. Selección de poblaciones de lámina propia de intestino delgado. Esquema representativo del análisis de subpoblaciones de linfocitos B de LP. Los datos corresponden a un ratón de fenotipo silvestre. El análisis se realizó con el software FlowJo v10, utilizando gráficas de contorno que muestran eventos individuales.

6.5 Los linfocitos B totales del ratón CD38^{-/-} se encuentran disminuidos en la cavidad peritoneal

En la figura 16 se presentan los números relativos de linfocitos B totales en bazo, cavidad peritoneal, lámina propia y placas de Peyer de ratones CD38^{-/-} comparados contra ratones de fenotipo silvestre. En la figura 17 se presentan los números absolutos en células sobre mg de tejido correspondiente de bazo, cavidad peritoneal, lámina propia y placas de Peyer. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

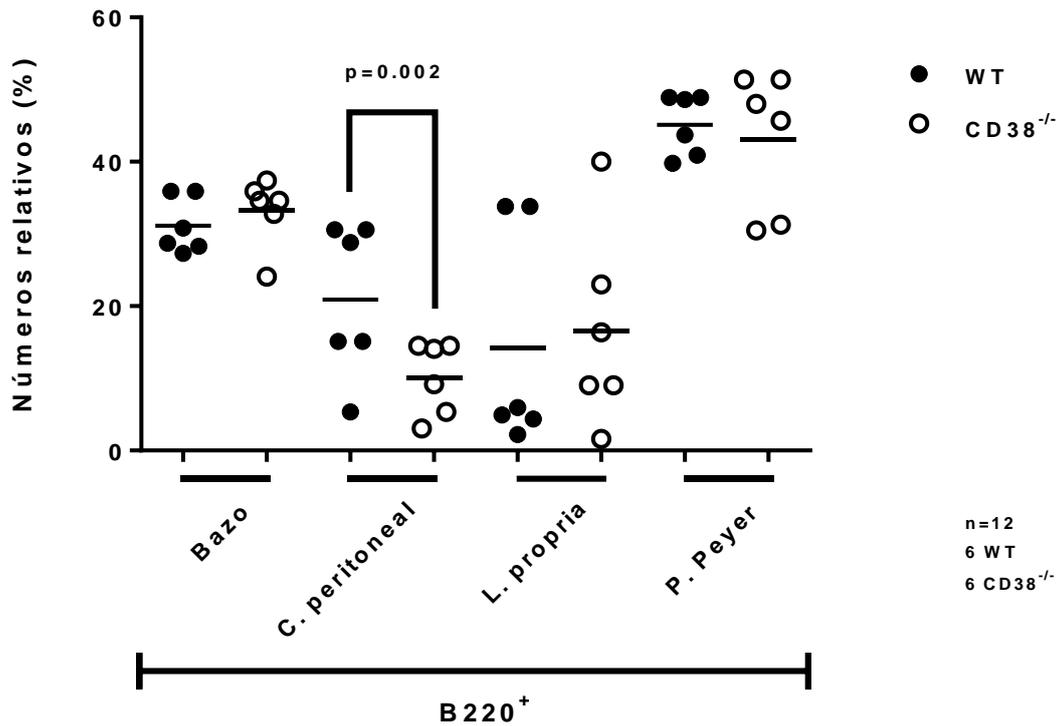


Figura 16. Números relativos de linfocitos B totales de diferentes nichos inmunitarios. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y los círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. Estos datos fueron obtenidos por citometría de flujo, tomando como 100 % los eventos leídos en el citómetro de flujo (50, 000), los porcentajes que se muestran corresponden a la proporción de eventos B220⁺ del total de eventos. En el gráfico de puntos: media de porcentajes de células B en bazo WT 29.75 %, CD38^{-/-} 34.6 %, media de porcentajes de células B en cavidad peritoneal WT 21.95 %, CD38^{-/-} 11.63 %, media de porcentajes de células B en lámina propia WT 5.45 %, CD38^{-/-} 12.72 %, media de porcentajes de células B en placas de Peyer WT 46.15 %, CD38^{-/-} 46.85 %. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

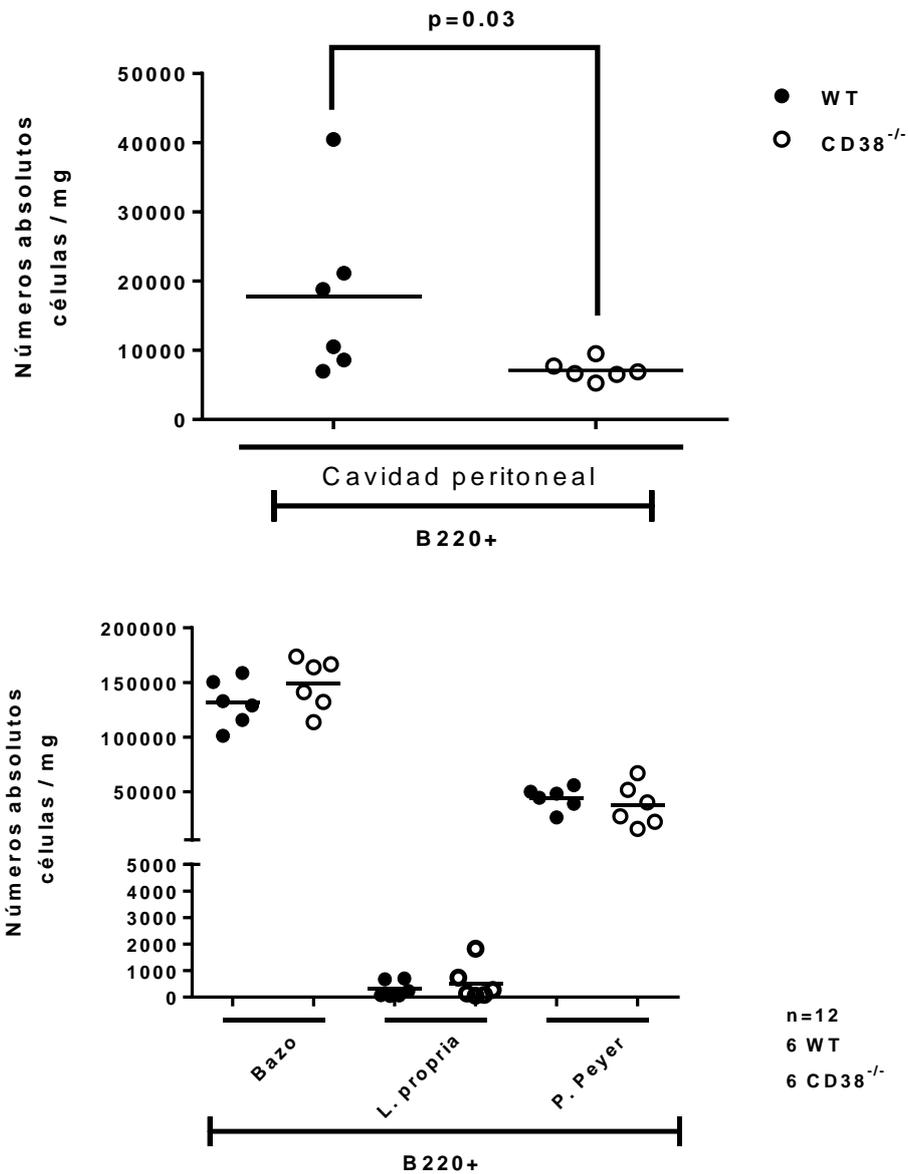


Figura 17. Números absolutos de linfocitos B totales en diferentes nichos inmunitarios. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y lo círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. Estos datos fueron obtenidos por citometría de flujo, haciendo una relación entre el porcentaje de eventos B220⁺ y los 50,000 eventos capturados, obteniendo los números absolutos con base en el peso de cada órgano. En el gráfico de puntos (panel superior): media de células de B en cavidad peritoneal WT 14,654 células / mg, CD38^{-/-} 6,771 células / mg. En el panel inferior: media de células de B en bazo WT 131,010 células / mg, CD38^{-/-} 152,593 células / mg; media de células B en lámina propia WT 151.3 células / mg, CD38^{-/-} 205.9 células / mg; media de células B en placas de Peyer WT 46,468 células / mg, CD38 KO 46.8%. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.6 Las subpoblaciones de linfocitos B en la cavidad peritoneal de ratones CD38^{-/-} se encuentran disminuidas

En la figura 18 se presentan los números relativos y absolutos de linfocitos B en cavidad peritoneal de ratones CD38^{-/-} comparados contra ratones de fenotipo silvestre. Los linfocitos B1a poseen el perfil de marcadores: B220⁺, CD23⁻, CD5⁺, el perfil de marcadores para B1b es: B220⁺, CD23⁻, CD5⁻, y para los linfocitos B2: B220⁺, CD23⁺, CD5⁻. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

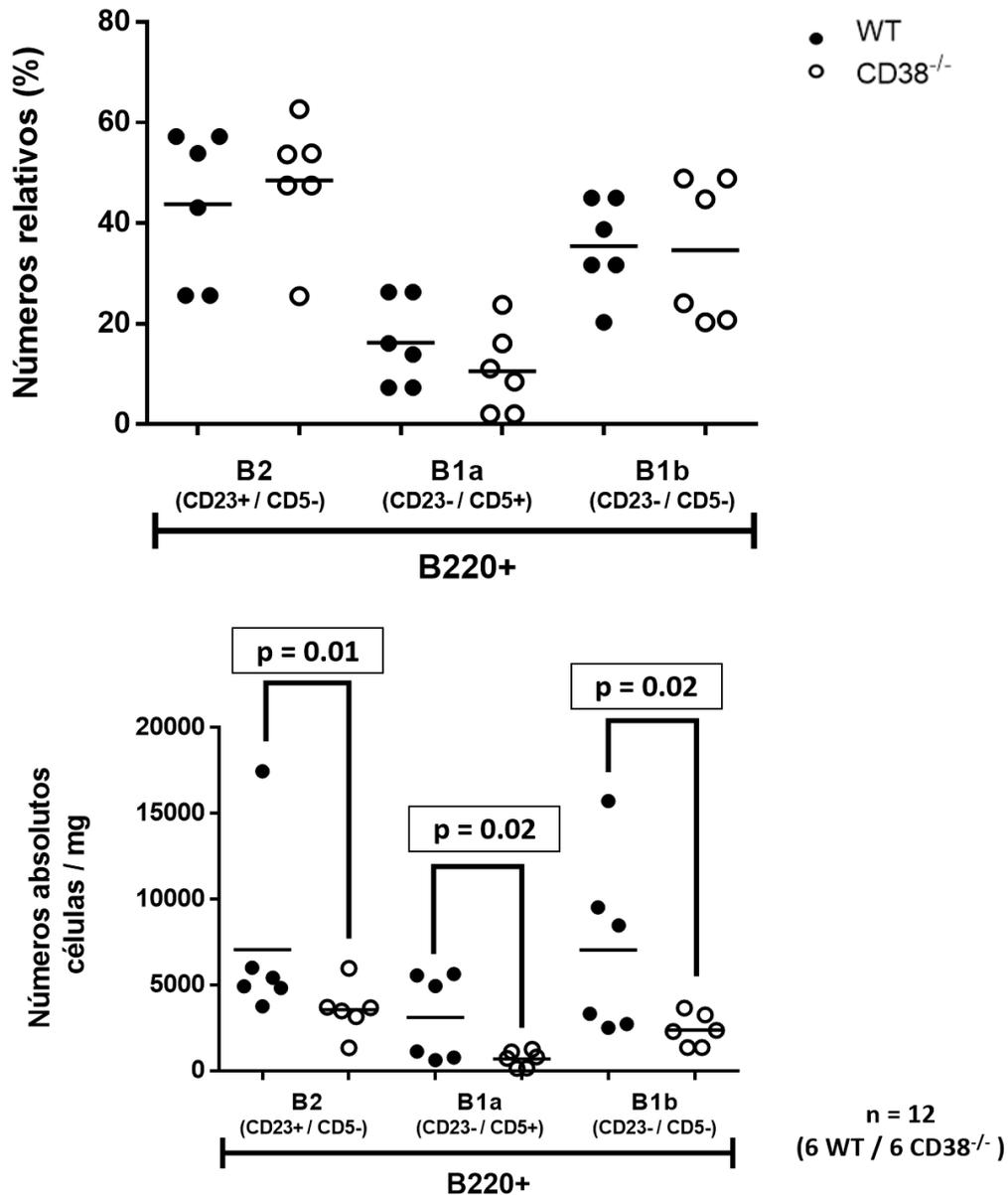


Figura 18. Números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en cavidad peritoneal. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y los círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de puntos (Panel superior): media de porcentajes de células B2 WT 48.5 %, CD38^{-/-} 50.6 %, media de porcentajes de células B1a WT 15 %, CD38^{-/-} 9.8 %, media de porcentajes de células B1b WT 35.25 %, CD38^{-/-} 34.45 %. En el gráfico de puntos (panel inferior): media de células B2 WT 5,171 células / mg, CD38^{-/-} 3,585 células / mg, media de células B1a WT 3,028 células / mg, CD38^{-/-}

766.7, media de células B1b WT 5,900 células / mg, CD38^{-/-} 2,329 células / mg. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.7 Las proporciones de células B2 y B1b se encuentran alteradas en las placas de Peyer de ratones CD38^{-/-}

En la figura 19 se presentan los números relativos y absolutos de linfocitos B en las placas de Peyer de ratones CD38^{-/-} comparados contra ratones de fenotipo silvestre. Los linfocitos B1a poseen el perfil de marcadores: B220⁺, CD23⁻, CD5⁺, el perfil de marcadores para B1b es: B220⁺, CD23⁻, CD5⁻, y para los linfocitos B2: B220⁺, CD23⁺, CD5⁻. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

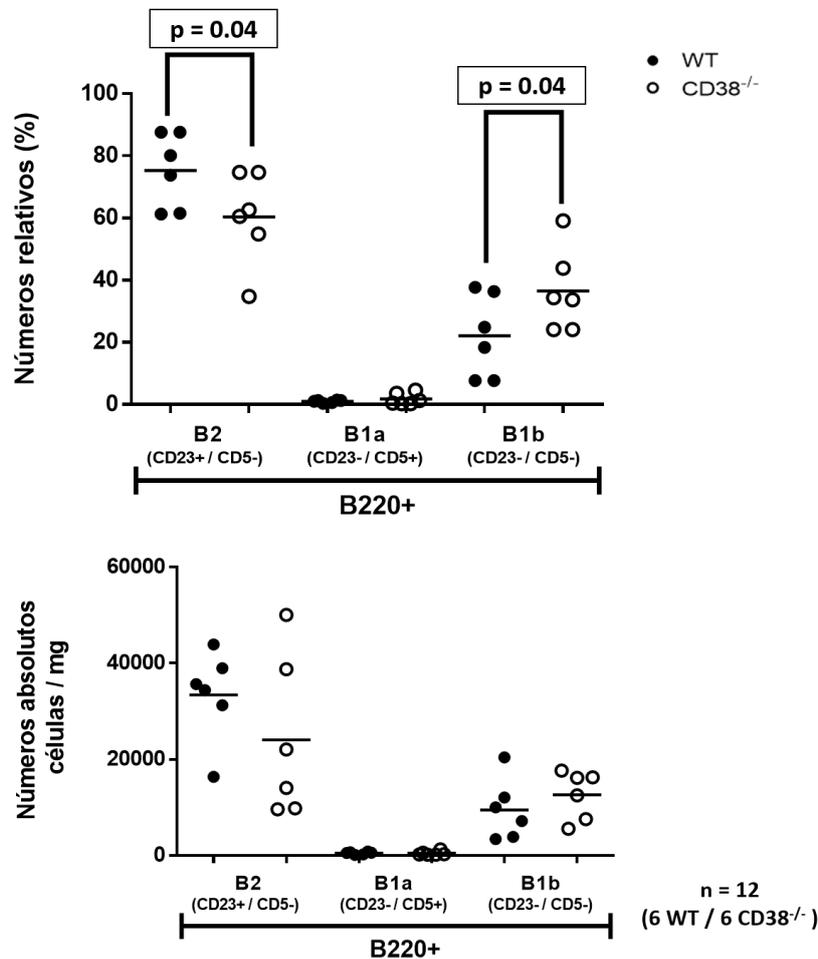


Figura 19. Números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en placas de Peyer. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y lo círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de puntos (panel superior): media de porcentajes de células B2 WT 76.95 %, CD38^{-/-} 61.55 %, media de porcentajes de células B1a WT 1.19 %, CD38^{-/-} 0.86 %, media de porcentajes de células B1b WT 21.65 %, CD38^{-/-} 34.05. En el gráfico de puntos (panel inferior): media de células B2 WT 35,058 células / mg, CD38^{-/-} 18,084 células / mg, media de células B1a WT 552.5 células / mg, CD38^{-/-} 252.7, media de células B1b WT 8,602 células / mg, CD38^{-/-} 14,360 células /

mg. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.8 El ratón CD38^{-/-} posee menos placas de Peyer que la contraparte silvestre

En la figura 20 se observan gráficas comparativas de la cantidad de placas de Peyer (panel superior) y el total de poblaciones de linfocitos T y B por placa de Peyer entre el ratón CD38^{-/-} contra el fenotipo silvestre (panel inferior). Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

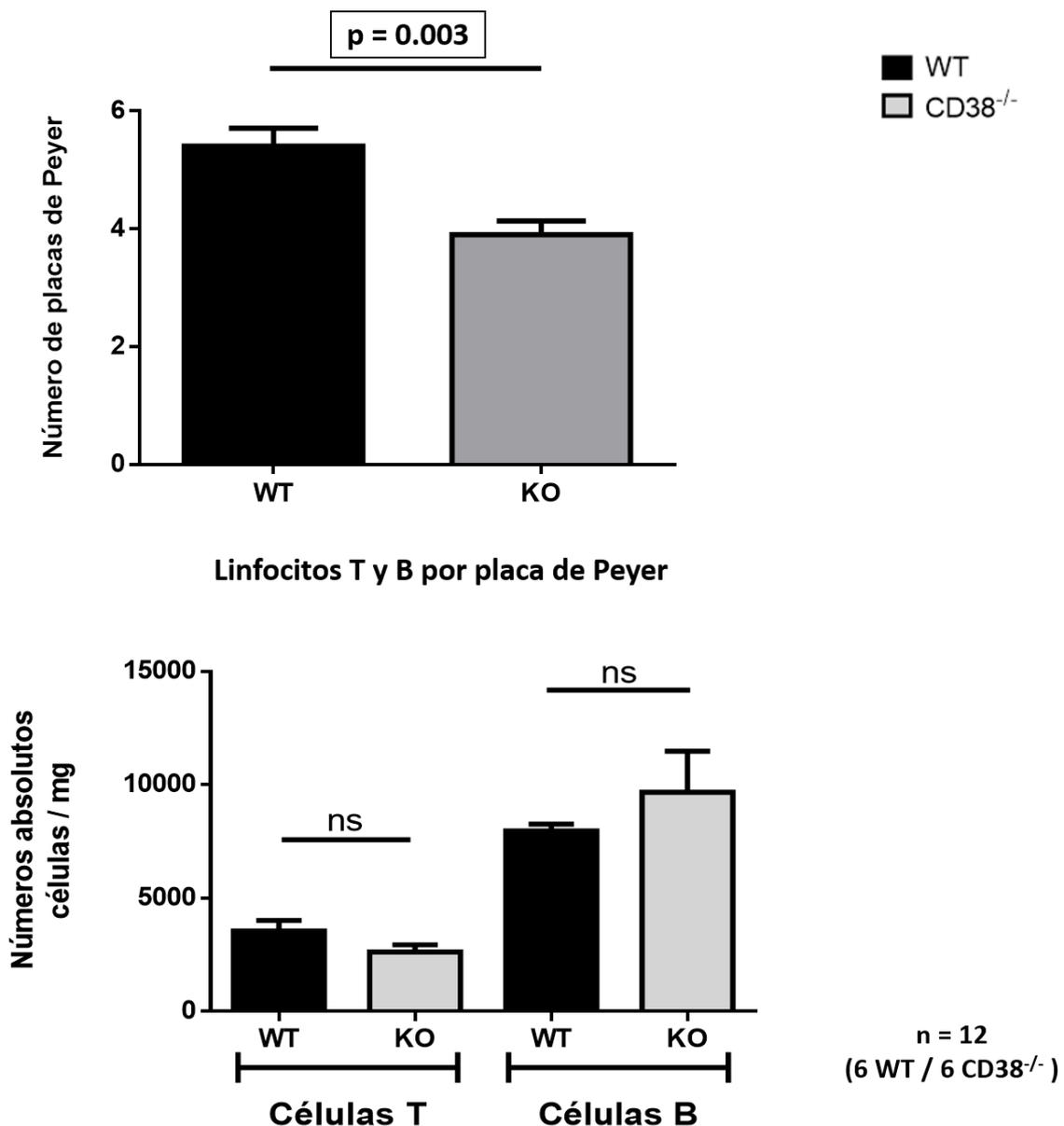


Figura 20. Cantidad de placas de Peyer y de linfocitos T y B de placas de Peyer. Las barras negras corresponden a los ratones WT y las barras grises a los ratones CD38^{-/-}. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38 KO = ratones knockout para CD38.

6.9 El ratón CD38^{-/-} posee menos células T en las placas de Peyer que la contraparte silvestre

En las figuras 21 y 22 se presenta una comparativa de la cantidad de de linfocitos T de placas de Peyer y en los otros nichos inmunitarios analizados en cuestiones de números relativos y absolutos entre el ratón CD38^{-/-} contra el fenotipo silvestre. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

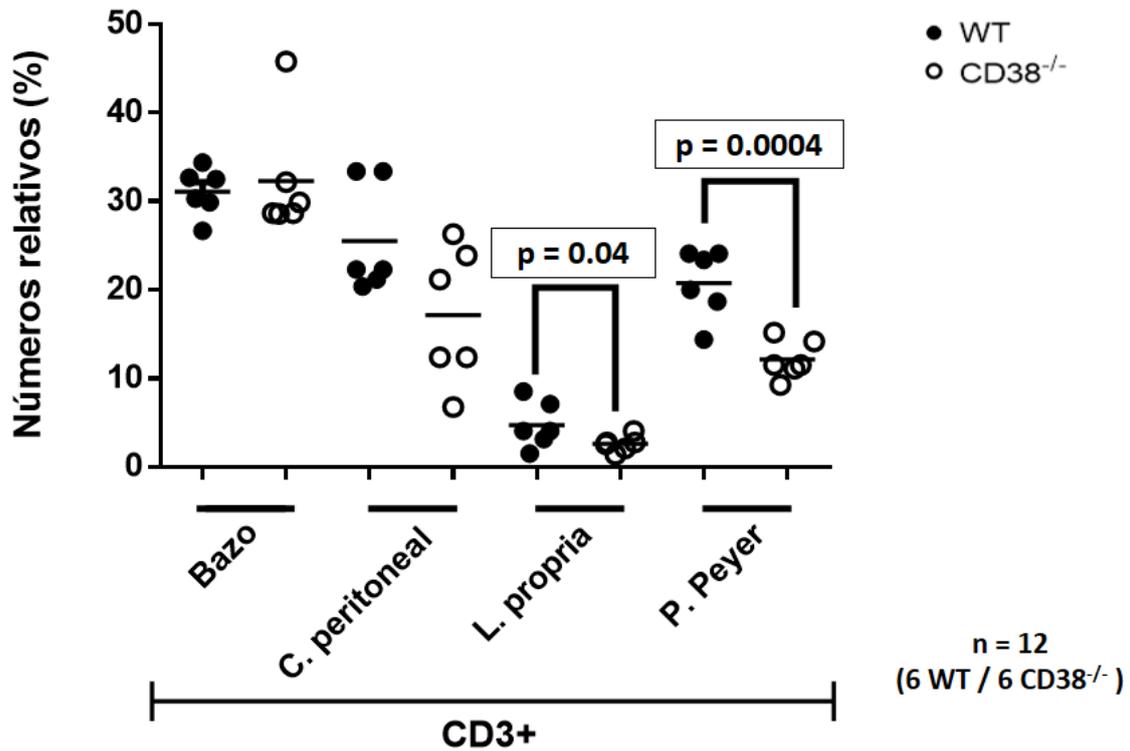


Figura 21. Números relativos de linfocitos T en diferentes nichos inmunitarios. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y los círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

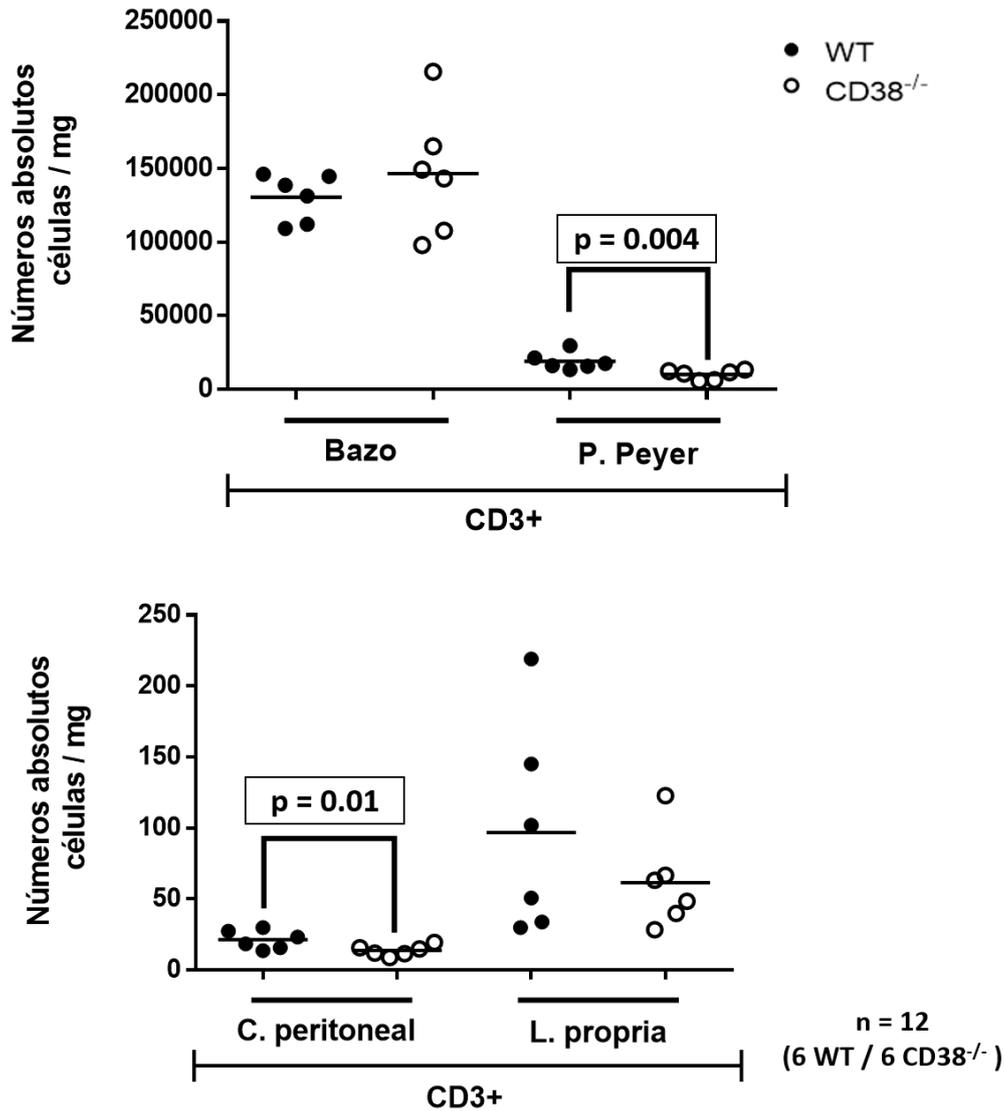


Figura 22. Números absolutos de linfocitos T en diferentes nichos inmunitarios. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y los círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. Prueba estadística T Student paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

6.10 El ratón CD38^{-/-} presenta una mayor cantidad de linfocitos B2 en la lámina propia del intestino delgado que la contraparte silvestre

En la figura 23 se presentan una comparativa de los números absolutos y relativos de las subpoblaciones de linfocitos B en la lámina propia del intestino delgado entre el ratón CD38^{-/-} contra el fenotipo silvestre. Los datos que se muestran corresponden a 6 ratones CD38^{-/-} y 6 ratones de fenotipo silvestre.

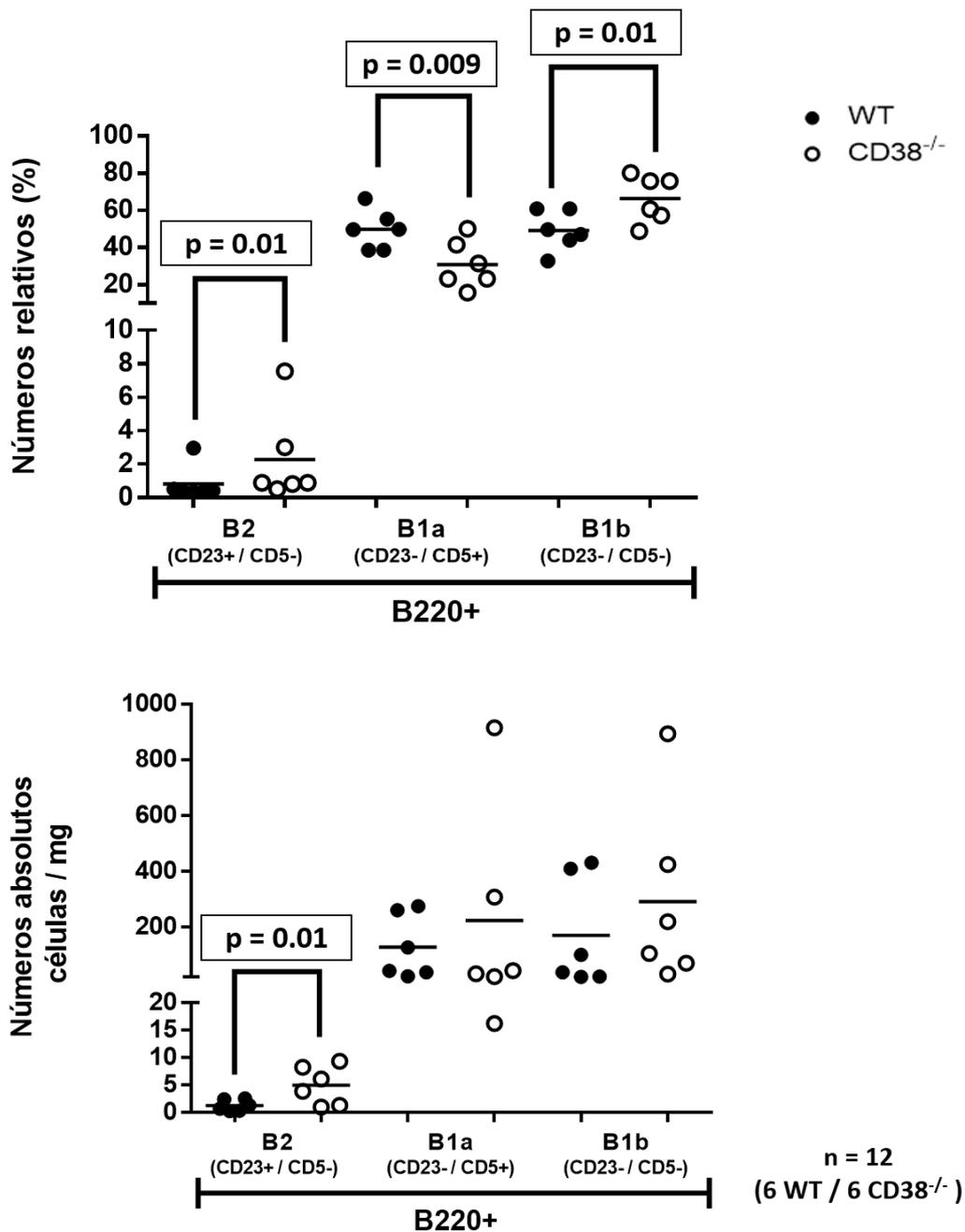


Figura 23. Números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en lámina propia de intestino delgado. Los círculos negros corresponden a los ratones WT y lo círculos blancos a los ratones CD38^{-/-}. En el gráfico de puntos (panel superior): media de porcentajes de células B2 WT 0.39 %, CD38^{-/-} 0.89 %, media de porcentajes de células B1a WT 49.75 %, CD38^{-/-} 27.35 %, media de porcentajes de células B1b WT 48.35 %, CD38^{-/-} 68.15. En el gráfico de puntos (panel inferior): media de células B2 WT 1.02 células / mg, CD38^{-/-} 4.9 células / mg, media de células B1a WT 83.80 células / mg, CD38^{-/-} 37.68 células / mg, media de células B1b WT 68.57 células / mg, CD38^{-/-} 161.9 células / mg. Prueba estadística T Student no paramétrica a una sola cola. WT = ratones de fenotipo silvestre. CD38^{-/-} = ratones knockout para CD38.

7. Discusión

La comparación de las concentraciones de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM séricas entre los ratones de fenotipo silvestre contra los CD38^{-/-} no presentó diferencias significantes. Éstos datos coinciden con los reportados para ratones C57BL/6 y los descritos por Debra Cockayne *et al* en las mismas condiciones (ratones mantenidos en condiciones SPF sin estímulo de infección o inflamación)^{20,41}. A pesar de observar una disminución de población de linfocitos B1 en la cavidad peritoneal de los ratones CD38^{-/-} en este proyecto, Isaza-Restrepo *et al* han comentado que esta población no está implicada en la cantidad de anticuerpos naturales séricos, los cuales van dirigidos principalmente contra antígenos de grupos sanguíneos y los producen linfocitos B de la zona marginal del bazo^{42,43}. Los anticuerpos a nivel sérico son menores en cantidad en comparación con aquéllos encontrados en las mucosas, debido a que estos sitios son el primer contacto con el medio externo y sus antígenos, como se muestra en la Figura 3. Por lo tanto, las poblaciones celulares que producen anticuerpos son abundantes aún en condiciones no infecciosas⁴⁴.

Por lo anterior y debido a que CD38 está implicado en la proliferación y activación de linfocitos B^{12,19,21}, resultaba importante cuantificar las concentraciones de anticuerpos en el lumen del intestino delgado de ratones CD38^{-/-} y compararlo contra ratones de fenotipo silvestre. Los datos obtenidos por ELISA para el fenotipo silvestre concuerdan con lo reportado por Shimada *et al*⁴⁵. La IgA intestinal se origina de células B que han pasado por SHM y CSR en los centros germinales del GALT⁴⁶. Nuestros resultados mostraron una concentración disminuida de anticuerpos IgA y una concentración de anticuerpos IgM aumentada en el lumen intestinal del ratón CD38^{-/-}, Bergqvist *et al* demostraron que en ausencia de CD40 (otra molécula implicada en la activación de los linfocitos B) los anticuerpos IgA en el lumen intestinal se encuentran disminuidos, y observaron que la CSR en las PP y LP de su modelo murino se ve afectada por la ausencia de CD40; es posible que la activación de células B se vea afectada de manera similar en ausencia de CD38 y por ello se encontró disminución de IgA en el lumen intestinal de nuestro modelo^{47,48}. Golby y Spencer discuten que en ausencia o deficiencia de IgA en el lumen intestinal, los anticuerpos IgM pueden compensar la respuesta inmunitaria en el sitio⁴⁹, las responsables de esta compensación pueden ser células B1, como lo encontrado por Bishnudeo Roy *et al* en el ratón L2 (que posee una mutación en la cadena ligera y reduce en un 30-50% sus poblaciones de linfocitos B2)⁵⁰. Estas células B1 podrían estar migrando a la mucosa intestinal desde la cavidad peritoneal, la cual es considerada un reservorio de células productoras de anticuerpos naturales^{42,43,51,52}.

Los rendimientos celulares para bazo, lámina propia, placas de Peyer y cavidad peritoneal, así como el peso de los órganos y los ratones, y el largo del intestino delgado coinciden con los parámetros anteriormente reportados por Rayavarapu *et al*, Yang *et al*, De Jesús *et al* y Ghosn *et al* respectivamente, indicando que el ratón CD38^{-/-} no presentó ninguna alteración en parámetros fisiométricos referentes a los sitios anatómicos estudiados con excepción del número de

placas de Peyer, menor en el ratón CD38^{-/-} (Figura 20), situación que se discutirá posteriormente ⁵³⁻⁵⁶.

De manera consistente, en las figuras 16 (números relativos) y 17 (números absolutos), se observan las proporciones y cantidades de linfocitos B totales (marcados con B220⁺) cuya disminución muestra significancia estadística en la cavidad peritoneal, sitio que se considera reservorio de linfocitos B preactivados, principalmente de linfocitos B1a; los cuales, junto con los B1b tienen la capacidad de migrar hacia sitios inmunitarios mucosales. Lo anterior ha sido reportado por Bishnudeo *et al* en su modelo de ratón L2, mencionado anteriormente ⁵⁰. Al migrar estas células al intestino delgado, secretan anticuerpos naturales dirigidos contra antígenos glicosilados y lipídicos principalmente y de manera regular, para el control del establecimiento y mantenimiento de la microbiota intestinal o como apoyo contra infecciones bacterianas, parasitarias o fúngicas ^{42,57,58}. Estos resultados pueden deberse a que los estímulos para la migración (CXCL13, integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$) hacia los reservorios de la cavidad peritoneal conocidos como *milky spots* ^{42,57}, dependan en cierta medida de CD38 como cotransductor de señal o a que los estímulos de activación en el sitio necesiten la coestimulación de CD38 para potenciar el efecto, como lo observado por Manjarrez-Orduño en el 2007, al coestimular células B de bazo con LPS (en ausencia de IL-4) y un anticuerpo anti-CD38, encontrando que CD38 potencia el efecto de activación y proliferación de células B en la vía de TLR ^{19,59,60}.

La figura 18 muestra que las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos B (B1a, B1b y B2) en la cavidad peritoneal no difieren entre los dos grupos aunque los números absolutos de todas las poblaciones se encuentran disminuidos en este sitio. Esto puede indicar que los efectos de CD38 implicados en proliferación, diferenciación o activación son importantes dependiendo del sitio inmunitario y no de la subpoblación de linfocitos B; como los discuten Oppezzo *et al* con el BCR, mencionando que se necesitan señales coestimuladoras que eviten la apoptosis y que además contribuyan a la activación de las células B, condiciones que se modifican dependiendo del microambiente ⁶¹. Sindhava *et al* mencionan que las vías principales de señalización para la activación de los linfocitos B1 en la cavidad peritoneal son BCR y TLR-4, y que la coestimulación de LPS con CD38 potencia la activación y proliferación de linfocitos B vía TLR, es posible que en ausencia de CD38 esta vía de activación en la cavidad peritoneal se encuentre afectada ^{19,62}.

Se puede apreciar en la figura 19, respecto a los números relativos y absolutos de subpoblaciones de linfocitos B en las PP, proporciones disminuidas de linfocitos B2 y aumentadas de linfocitos B1b, esto puede explicarse por una migración en pequeñas cantidades de los linfocitos B1b, la migración de linfocitos B1 a las placas de Peyer ha sido demostrada por Berberich *et al*, encontrando además que este proceso es dependiente de CXCR5 ^{57,63}. Se sabe que el principal estímulo para la salida de los linfocitos B hacia el MLN es CXCR4 ^{30,64} y que las células B activadas de centro germinal en este sitio inductor migrarán al MLN y posteriormente a circulación sanguínea para regresar por ecotaxia a la lámina propia intestinal, donde terminarán de diferenciarse a células plasmáticas

productoras de anticuerpos. Los datos de la Figura 23 sugieren que la ausencia de CD38 tiene consecuencias en este sitio, esto se discute más adelante ^{18,29}.

Macroscópicamente fue posible apreciar que el ratón CD38^{-/-} contaba con menos PP que el fenotipo control, lo que significaría que CD38 podría estar implicado en la generación del centro germinal. Veiga-Fernandes *et al*, describen que las células inductoras de tejido linfoide (LTi, Lymphoid-Tissue Inducer) tienen un papel clave en la organogénesis de las PP. Se sabe que estas células LTi, bajo determinados estímulos, pueden diferenciarse a células T, NK, DC o B ^{65,66}. Al ser precursores de algunas subpoblaciones de T y dado que Sandoval-Montes en 2005 describió que CD38 está implicada en la activación de linfocitos T (potenciando la secreción de citocinas) ⁶⁷, es posible que la ausencia de CD38 afecte a las células LTi y esto reduzca la cantidad de PP, dato que pudiera estar relacionado con una baja en las poblaciones de linfocitos. Tanto las proporciones como las cantidades de linfocitos T en las PP se encuentran disminuidas (Figuras 21 y 22), Smith-Garvin *et al* refieren que las señales de activación de los linfocitos T están relacionadas con señales de supervivencia, en ausencia de CD38 (molécula implicada en la activación de los linfocitos T), éstos pudieran estar dirigiéndose a apoptosis en el sitio inductor del GALT ^{67,68}.

Se sabe que las PP poseen un microambiente con estímulos como BAFF y APRIL, secretados por DC, células epiteliales y monocitos; APRIL es secretado por linfocitos T activados y estos estímulos dirigen el cambio de isotipo hacia IgA ^{69,70}. La disminución de linfocitos T en las PP, de lo cual se infiere una menor producción de APRIL, pudiera explicar, desde otro acercamiento, la disminución de anticuerpos IgA en el lumen intestinal (Figura 7) ⁷¹.

En la figura 22, tanto en números relativos como en absolutos, se observa un aumento de las poblaciones de linfocitos B2 en la LP del intestino delgado, sitio en donde los linfocitos B2 terminan de diferenciarse a células plasmáticas productoras de IgA ⁷², y donde los linfocitos B1 reciben estímulos independientes de T como IL-10 y APRIL para la CSR hacia IgA ⁷³. Brandtzaeg *et al* describen que la diferenciación terminal de los linfocitos B2 a células plasmáticas ocurre en la LP. Los datos obtenidos sugieren que en ausencia de CD38, los linfocitos B2 de la LP intestinal no logren diferenciarse a células plasmáticas, similar a lo descrito por Zotos *et al* para el ratón IL-21^{-/-} ⁷⁴.

En la figura 24 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este proyecto a manera de esquema. Mostrando la disminución de anticuerpos IgA y el aumento de anticuerpos IgM en el lumen intestinal, que provienen de células plasmáticas y de linfocitos B1 de la LP respectivamente; las células plasmáticas que se generan de precursores B2 provienen principalmente de las PP y los linfocitos B1 de la cavidad peritoneal, trabajando en conjunto para mantener la homeostasis del sitio.

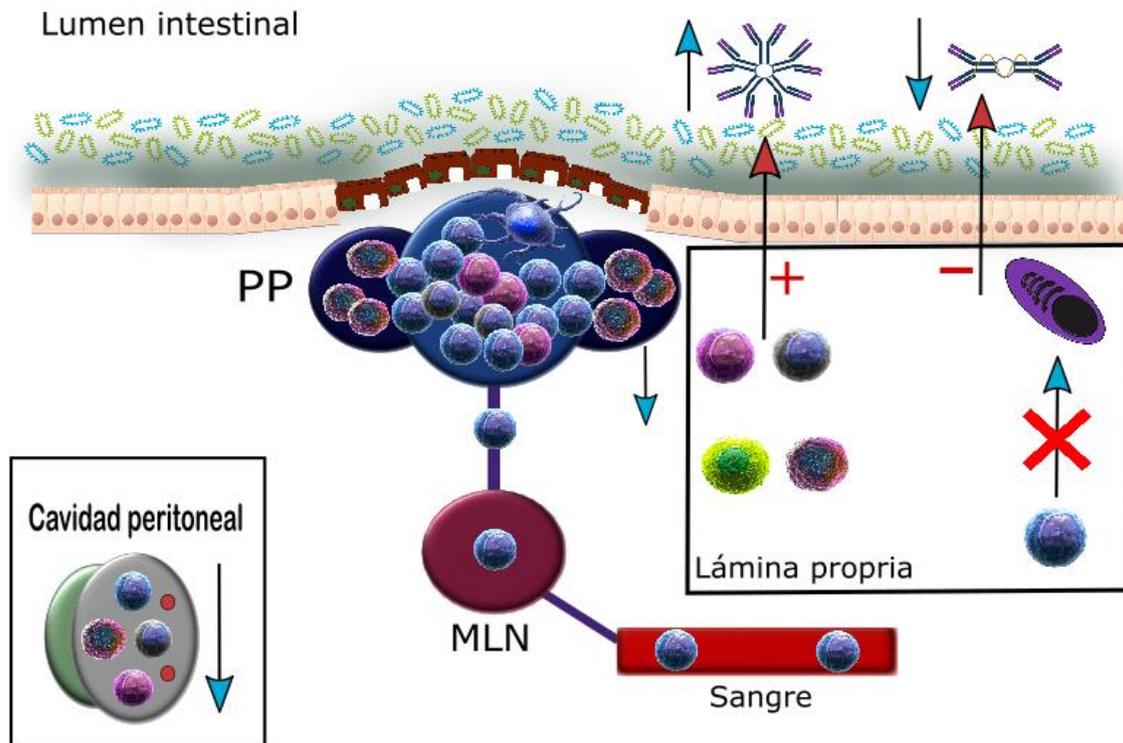


Figura 24. Esquema representativo de los resultados obtenidos en este proyecto. En el lumen inestinal se observa a la microbiota comensal, niveles incrementados de anticuerpos IgM y disminuidos de IgA. Cruzando la barrera epitelial, debajo de las células M (café), las PP con DC en el domo subepitelial que migran hacia la zona folicular (azul claro) para encontrarse con los linfocitos B2 (azul oscuro), también existen en esta zona linfocitos B1a (negros) y B1b (morados). En las áreas parafoliculares (azul oscuro) encontramos una zona con linfocitos T (núcleo azul oscuro, citoplasma rojo claro). En color guinda se representa el MLN y en rojo la circulación sanguínea. Debajo de la mono capa de células epiteliales (rosa) se encuentra la lámina propia, con linfocitos T reguladores (verde claro) y células plasmáticas (morado con núcleo negro). Las flechas rojas señalan la secreción de anticuerpos y las azules las variaciones en las poblaciones celulares.

8. Conclusiones

Niveles de anticuerpos séricos y de lumen intestinal. La ausencia de CD38 no afectó las cantidades de anticuerpos a nivel sérico, pero en los lavados de lumen intestinal, la ausencia de dicha molécula afectó las cantidades de anticuerpos de clase IgA, disminuyéndolos, y de clase IgM, aumentándolos.

Rendimientos celulares. Los rendimientos celulares de bazo, lavado de cavidad peritoneal, placas de Peyer y lámina propia no se observaron afectados en sus números relativos o absolutos por la ausencia de CD38.

Células B totales. Las células B totales de cavidad peritoneal en cuestiones de proporción y cantidad, se encontraron disminuidas en ausencia de CD38, aunque esta condición no afectó las proporciones ni cantidades de células B totales de bazo, placas de Peyer o lámina propia.

Subpoblaciones de células B. La ausencia de CD38 afectó las cantidades de las subpoblaciones B1a, B1b y B2 de la cavidad peritoneal disminuyéndolas, pero mantuvieron sus proporciones respecto al porcentaje inicial de B totales.

La ausencia de CD38 no afectó las cantidades de las subpoblaciones de linfocitos B1a, B1b o B2 en las placas de Peyer, pero las proporciones de linfocitos B2 disminuyeron y las de B1b aumentaron en ausencia de esta molécula. En las placas de Peyer, la ausencia de CD38 las proporciones y cantidades de linfocitos T se encontraron disminuidas.

Los linfocitos B2 de la lámina propia intestinal se encontraron aumentados en proporción y número en ausencia de CD38. Las poblaciones de B1a y B1b modificaron sus porcentajes pero la ausencia de esta molécula no afectó sus números absolutos.

La ausencia de CD38 afectó las cantidades de anticuerpos en el lumen del intestino delgado del modelo murino, se encontró un aumento de anticuerpos IgM y una disminución de IgA. La ausencia de esta molécula afectó las proporciones y cantidades de linfocitos B2 en la LP de intestino delgado, que se observaron aumentadas; la disminución de anticuerpos IgA y el aumento de linfocitos B2 en la LP sugieren que la diferenciación hacia células plasmáticas en el sitio está afectada por la ausencia de CD38. También se encontraron cantidades de linfocitos B1a, B1b y B2 disminuidas en la cavidad peritoneal, este dato sugiere que CD38 puede estar implicada en la proliferación de células en este nicho inmunitario.

9. Perspectivas

Generar un modelo de infección intestinal para comprar los datos obtenidos en este trabajo en condiciones SPF contra condiciones infecciosas. Es posible que el reto infeccioso en el GALT de a notar en mayor medida los efectos de la ausencia de CD38. Los datos obtenidos por Adrian Zuercher demuestran que la inmunización por vía nasal de reovirus tipo I induce respuesta humoral en la mucosa intestinal ⁷⁵.

Cuantificar comparativamente células plasmáticas entre los ratones de fenotipo silvestre y CD38^{-/-}, en este proyecto se observaron linfocitos B y el producto final de la inmunidad humoral, los anticuerpos, se considera relevante analizar a las células plasmáticas de la mucosa intestinal para anclar de mejor manera los datos obtenidos.

Analizar la capacidad de activación y proliferación de las subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal con el fin de saber el motivo de la disminución de las subpoblaciones de B en el sitio. Esto puede realizarse por microscopía *in vivo* de dos fotones, inoculando previamente a los ratones con estímulos para activación y proliferación como IL-4, LPS, o toxina de cólera.

Analizar las subpoblaciones de T en los sitios inductor y efector de la respuesta inmunitaria en el intestino delgado.

10. Referencias bibliográficas

1. Flajnik MF. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(7):438-453. doi:10.1038/s41577-018-0003-9.
2. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):185-189. doi:10.1038/nri3803.
3. Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev*. 2010;238(1):37-46. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x.
4. LeBien TW, Tedder TF. ASH 50th anniversary review B lymphocytes : how they develop and function. *Am Soc Hematol*. 2008;112(5):1570-1580. doi:10.1182/blood-2008-02-078071.
5. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: Step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003;24(6):342-348. doi:10.1016/S1471-4906(03)00119-4.
6. Goenka R, Scholz JL, Naradikian MS, Cancro MP. Memory B cells form in aged mice despite impaired affinity maturation and germinal center kinetics. *Exp Gerontol*. 2014;54(10):109-115. doi:10.1016/j.exger.2013.12.013.
7. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity*. 2012;36(1):13-23. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.017.
8. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):959-971. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.046.
9. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):230-242. doi:10.1038/nri1572.
10. Donís-Hernández FR, Parkhouse RME, Santos-Argumedo L. Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice. *Eur J Immunol*. 2001;31(4):1261-1267. doi:10.1002/1521-4141(200104)31:4<1261::AID-IMMU1261>3.0.CO;2-H.
11. Lund F, Solvason N, Grimaldi JC, Michael R, Parkhouse E, Howard M. Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol Today*. 1995;16(10):469-473. doi:10.1016/0167-5699(95)80029-8.
12. Rodríguez-alba JC, Moreno-garcía ME, Sandoval-montes C, Víctor H, Rodri JC, Moreno-garcı ME. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. 2008;111(7):3644-3652. doi:10.1182/blood-2007-08-107714.
13. Vences-Catalán F, Santos-Argumedo L. CD38 through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life*. 2011;63(10):840-846. doi:10.1002/iub.549.
14. Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Levy S, Santos-Argumedo L. The CD19/CD81 complex physically interacts with CD38 but is not required to induce proliferation in mouse B lymphocytes. *Immunology*. 2012;137(1):48-55. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03602.x.
15. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev*. 2010;237(1):140-159. doi:IMR940 [pii] 10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x.

16. Hardy RR. B-1 B Cell Development. *J Immunol.* 2006;177(5):2749-2754. doi:10.4049/jimmunol.177.5.2749.
17. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity.* 2015;42(4):607-612. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005.
18. Tangye SG. Staying alive: Regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.* 2011;32(12):595-602. doi:10.1016/j.it.2011.09.001.
19. Manjarrez-Orduño N, Moreno-García ME, Fink K, Santos-Argumendo L. CD38 cross-linking enhances TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):358-367. doi:10.1002/eji.200636453.
20. Cockayne D a, Muchamuel T, Grimaldi JC, et al. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood.* 1998;92(4):1324-1333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694721>.
21. Romero-Ramírez H, Morales-Guadarrama MT, Pelayo R, López-Santiago R, Santos-Argumendo L. CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. *Immunology.* 2015;144(2):271-281. doi:10.1111/imm.12370.
22. Quarona V, Zaccarello G, Chillemi A, et al. CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2013;84(4):207-217. doi:10.1002/cyto.b.21092.
23. Spencer J, Klavinskis LS, Fraser LD. The human intestinal igA response; burning questions. *Front Immunol.* 2012;3(MAY):1-10. doi:10.3389/fimmu.2012.00108.
24. Gibbons DL, Spencer J. Mouse and human intestinal immunity: same ballpark, different players; different rules, same score. *Mucosal Immunol.* 2011;4(2):148-157. doi:10.1038/mi.2010.85.
25. Ahluwalia B, Magnusson MK, Öhman L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol.* 2017;0(0):1-9. doi:10.1080/00365521.2017.1349173.
26. Vega-López MA, Arenas-Contreras G, Bailey M, et al. Development of Intraepithelial Cells in the Porcine Small Intestine. *Dev Immunol.* 2001;8(2):147-158. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2276065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
27. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(12):953-964. doi:10.1038/nri1499.
28. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(10):667-685. doi:10.1038/nri3738.
29. Spencer J, Sollid LM. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol.* 2016;9(5):1113-1124. doi:10.1038/mi.2016.59\rm201659 [pii].
30. Reboldi A, Cyster JG. Peyer's patches: Organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunol Rev.* 2016;271(1):230-245. doi:10.1111/imr.12400.
31. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: Induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009;70(6):505-515. doi:10.1111/j.1365-

3083.2009.02319.x.

32. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 2013;6(4):666-677. doi:10.1038/mi.2013.30.
33. Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for anti-microbial defense. *Front Immunol.* 2013;4(AUG):1-17. doi:10.3389/fimmu.2013.00222.
34. Guzman-Bautista ER, Ramirez-Estudillo MC, Rojas-Gomez OI, Vega-Lopez MA. Tracheal and bronchial polymeric immunoglobulin secretory immune system (PISIS) development in a porcine model. *Dev Comp Immunol.* 2015;53(2):271-282. doi:10.1016/j.dci.2015.07.010.
35. Corthésy B. Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009;31(2):174-179. doi:10.1080/08923970802438441.
36. Schroeder HWJ, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S41-S52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.Structure.
37. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthésy B. Secretory component: A new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity.* 2002;17(1):107-115. doi:10.1016/S1074-7613(02)00341-2.
38. Strugnell RA, Wijburg OLC. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):656-667. doi:10.1038/nrmicro2384.
39. Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol.* 2013;4(JUL):1-11. doi:10.3389/fimmu.2013.00185.
40. Faria AMC, Reis BS, Mucida D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *J Exp Med.* 2017;214(5):1211-1226. doi:10.1084/jem.20162014.
41. Klein-Schneegans AS, Kuntz L, Fonteneau P, Loor F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL 6 mice and their congenics at the *Ipr* (lymphoproliferation) locus. *J Autoimmun.* 1989;2(6):869-875. doi:10.1016/0896-8411(89)90013-9.
42. Mebius RE. Lymphoid Organs for Peritoneal Cavity Immune Response: Milky Spots. *Immunity.* 2009;30(5):670-672. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.005.
43. Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, Vargas-Barato F, Riveros-Dueñas R. The peritoneum: Beyond the tissue - A review. *Front Physiol.* 2018;9(JUN):1-12. doi:10.3389/fphys.2018.00738.
44. Woof JM, Mestecky J. Mucosal Immunoglobulins. *Mucosal Immunol Fourth Ed.* 2015;1-2:287-324. doi:10.1016/B978-0-12-415847-4.00017-3.
45. Shimada S, Kawaguchi-Miyashita M, Kushiro a, et al. Generation of polymeric immunoglobulin receptor-deficient mouse with marked reduction of secretory IgA. *J Immunol.* 1999;163:5367-5373.
46. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev.* 2014;260(1):76-85. doi:10.1111/imr.12189.
47. Farstad IN, Farstad IN, Carlsen H, et al. Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics. *Immunology.* 2000;101(3):354-363. doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00118.x.

48. Bergqvist P, Gardby E, Stensson A, Bemark M, Lycke NY. Gut IgA Class Switch Recombination in the Absence of CD40 Does Not Occur in the Lamina Propria and Is Independent of Germinal Centers. *J Immunol.* 2006;177(11):7772-7783. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7772.
49. Golby SJC, Spencer J. Where do IgA plasma cells in the gut come from? *Gut.* 2002;51(2):150-151. doi:10.1136/gut.51.2.150.
50. Roy B, Agarwal S, Brennecke AM, et al. B-1-cell subpopulations contribute differently to gut immunity. *Eur J Immunol.* 2013;43(8):2023-2032. doi:10.1002/eji.201243070.
51. Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective roles of natural IgM antibodies. *Front Immunol.* 2012;3(APR):1-10. doi:10.3389/fimmu.2012.00066.
52. Holodick NE, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM. Defining natural antibodies. *Front Immunol.* 2017;8(JUL):2-9. doi:10.3389/fimmu.2017.00872.
53. De Jesus M, Ahlawat S, Mantis NJ. Isolating and immunostaining lymphocytes and dendritic cells from murine Peyer's patches. *J Vis Exp.* 2013;(73):e50167. doi:10.3791/50167.
54. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(6):2568-2573. doi:10.1073/pnas.0915000107.
55. Rayavarapu S, Van der meulen JH, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Nagaraju K, Knobloch SM. Characterization of dysferlin deficient SJL/J mice to assess preclinical drug efficacy: Fasudil exacerbates muscle disease phenotype. *PLoS One.* 2010;5(9). doi:10.1371/journal.pone.0012981.
56. Yang PY, Zou H, Lee C, et al. Stapled, Long-Acting Glucagon-like Peptide 2 Analog with Efficacy in Dextran Sodium Sulfate Induced Mouse Colitis Models. *J Med Chem.* 2018;61(7):3218-3223. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00768.
57. Berberich S, Dahne S, Schippers A, et al. Differential Molecular and Anatomical Basis for B Cell Migration into the Peritoneal Cavity and Omental Milky Spots. *J Immunol.* 2008;180(4):2196-2203. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2196.
58. Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Carragher DM, et al. Omental Milky Spots Develop in the Absence of Lymphoid Tissue-Inducer Cells and Support B and T Cell Responses to Peritoneal Antigens. *Immunity.* 2009;30(5):731-743. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.014.
59. Cunningham AF, Flores-Langarica A, Bobat S, et al. B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1-11. doi:10.3389/fimmu.2014.00535.
60. Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, et al. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity.* 2015;43(3). doi:10.1016/j.immuni.2015.08.007.
61. Oppezzo P, Dighiero G. Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2013;3(9):1-9. doi:10.1038/bcj.2013.45.
62. Sindhava VJ, Bondada S. Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Front Immunol.* 2012;3(DEC):1-6. doi:10.3389/fimmu.2012.00372.
63. Berberich S, Förster R, Pabst O. *The Peritoneal Micromilieu Commits B Cells to*

- Home to Body Cavities and the Small Intestine* .; 2018. doi:10.1182/blood-2006-12-064345.
64. Schmidt TH, Bannard O, Gray EE, Cyster JG. CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches. *J Exp Med*. 2013;210(6):1099-1107. doi:10.1084/jem.20122574.
 65. Veiga-Fernandes H, Coles MC, Foster KE, et al. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's Patch organogenesis. *Nature*. 2007;446:547. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05597>.
 66. Van De Pavert SA, Mebius RE. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(9):664-674. doi:10.1038/nri2832.
 67. Sandoval-Montes C, Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J Leukoc Biol*. 2005;77(4):513-521. doi:10.1189/jlb.0404262.
 68. Smith-garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. NIH Public Access. 2010:591-619. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.T.
 69. MacPherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):11-22. doi:10.1038/mi.2007.6.
 70. Lycke NY, Bemark M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: Recent developments. *Mucosal Immunol*. 2017;10(6):1361-1374. doi:10.1038/mi.2017.62.
 71. Malavasi F, Deaglio S, Funaro a D a, et al. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase / CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiol Rev*. 2008;88:841-886. doi:10.1152/physrev.00035.2007.
 72. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):31-37. doi:10.1038/mi.2007.9.
 73. Cerutti A. Location , location , location : B-cell differentiation in the gut lamina propria. 2008;1(1):2007-2009. doi:10.1038/mi.2007.8.
 74. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell – intrinsic mechanism. 2010;207(2):365-378. doi:10.1084/jem.20091777.
 75. Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. Nasal-Associated Lymphoid Tissue Is a Mucosal Inductive Site for Virus-Specific Humoral and Cellular Immune Responses. *J Immunol*. 2002;168(4):1796-1803. doi:10.4049/jimmunol.168.4.1796.

11. Anexos

11.1 Estandarización de la digestión enzimática de lámina propia de intestino delgado murino

11.1.1 Técnica general

- 1) Sacrificar al animal por dislocación cervical.
- 2) Colocar y fijar al ratón en una superficie óptima para su manejo.
- 3) Escindir la piel del mesogastrio y la barrera peritoneal exponiendo los órganos internos.
- 4) Localizar el ciego o el estómago, tomar el intestino delgado adyacente a éste y seccionar de ambos extremos. Tomar medida del largo del intestino.
- 5) Situar al intestino en una caja de Petri con PBS frío y realizar con una jeringa de 3 mL un lavado de la luz intestinal con PBS frío.
- 6) Colocar al intestino sobre papel absorbente (el cual proporciona soporte), retirar la grasa del mesenterio que pudiese estar adherida y seccionar las placas de Peyer.
- 7) Cortar al intestino de manera transversal en segmentos de 1 – 2 cm de largo. Posterior a ello, cortar longitudinalmente estos segmentos.
- 8) Se realizaron dos lavados a los fragmentos intestinales con solución de desprendimiento (30 mL HBSS sin Ca ni Mg + 60 µL EDTA 0.5 M + 90 µL DTT) en matraz de teflón por 30 minutos a 37°C en agitación. Posterior a cada lavado, se enjuagó con PBS entre cada uno y se recuperó el tejido de intestino, fue desechada la suspensión celular (que contiene IEL y células epiteliales). Fueron tomadas muestras representativas de cada lavado y procesadas como indica en los pasos del 10 al 12
- 9) Se lavó dos veces con solución de digestión (25 mL HBSS + 35 mg Colagenasa II + 12.5 mg de dispasa) en matraz de teflón por 40 minutos a 37°C en agitación y se recuperó la suspensión celular lavando con PBS y centrifugando a 700 G por 5 min a 4°C. De considerar necesario se realizó un lavado de la suspensión celular total filtrando, centrifugando en las condiciones mencionadas y resuspendiendo en un volumen de 3 mL de HBSS completo. Fueron tomadas muestras representativas de cada lavado y procesadas como indica en los pasos del 10 al 12.
- 10) Inmediatamente, colocar las muestras de tejido en casetes de biopsia y posicionar estos en formaldehído al 4 %.
- 11) Dejar fijar en formaldehído de 24 a 48 horas.
- 12) Trasvasar las muestras a etanol al 70 % por 24 a 48 horas.

11.1.1.1 Deshidratar y embeber muestras

- 13) Deshidratar las muestras siguiendo el tren de soluciones de la tabla 2:
- 14) Antes de que pase el tiempo de Xileno (2), se deberá tener un matraz de Kitasato con parafina derretida en baño maría sobre una parrilla, procurando que el agua quede justo al nivel de la parafina. Colocar suficiente parafina para la cantidad de casetes a trabajar, aprox. 100 cc de parafina por cada 10 casetes.

- 15) Posterior al tren de deshidratación, trasvasar las muestras con cuidado hacia el matraz de Kitasato.
- 16) Someter las muestras a vacío por 3 horas, agitando periódicamente el matraz para ir desplazando el aire que aún contengan.
- 17) Trasvasar las muestras con parafina suficiente para cubrirlas a uno o dos recipientes metálicos según sea necesario.
- 18) Dejar los recipientes en baño maría para que la parafina se mantenga en estado líquido.
- 19) Tomar uno por uno los casetes de biopsia y, retirar la tapa, extraer la muestra y seccionarla en fragmentos de aproximadamente 1.5 - 3.5 mm de largo con el fin de poder colocarlos a manera de pequeños cilindros capaces de sostenerse por sí solos en el molde (al cual se le adicionarán de 1 a 2 mL de parafina antes de colocar el tejido).
- 20) Mantener el molde a 60 °C hasta que se le coloque el tejido, posteriormente, enfriar ligeramente la cara basal del mismo, cuidando que no se solidifique el total de la parafina.
- 21) Adicionar parafina suficiente para cubrir el tejido, de manera suave para evitar mover indeseadamente los cilindros intestinales. Cubrir con el casete de biopsia sin tapa y de nuevo adicionar parafina, esta vez con el fin de cubrir la muestra restante que se encuentra aún en el casete.
- 22) Enfriar gradualmente a diferentes temperaturas (ambiente, sobre aluminio frío, sobre hielo) aprox. 10 min cada una.
- 23) Guardar a 4 °C en un recipiente flexible hasta su posterior uso (dejar al menos una noche a 4 °C).

11.1.1.2 Cortes en micrótopo

- 24) Asegurarse de que el micrótopo se encuentre limpio, con los seguros del tren y del móvil colocados adecuadamente.
- 25) Preparar todos los materiales y equipo necesario (baño María de 50 °C – 55 °C, termómetro, laminillas silanizadas suficientes, papel adsorbente, bolsa de residuos acoplada al aparato, muestras en un recipiente termoestable con hielo, bloque de hielo sólido, pinceles de 000 a 10x0).
- 26) Colocar navaja de corte.
- 27) Colocar el casete de biopsia con la muestra embebida en el porta muestras y ajustarlo. Ajustar distancia de este respecto a la navaja de corte.
- 28) Realizar cortes de devastación (en caso de ser bloque sin cortes previos), hasta llegar a la muestra de tejido.
- 29) Cortar secciones de 3 cortes y colocarlas en baño María.
- 30) Esperar de 3 – 5 min hasta su completa extensión y recuperarlos en laminillas silanizadas.
- 31) Agitar rápidamente las laminillas para sacar toda el agua posible de los cortes y colocar estas en una parrilla a 60 °C.
- 32) Dejar secar por 3 horas en la parrilla y una noche a 37 °C.

11.1.1.3 Rehidratación y tinción de los cortes.

- 33)Rehidratar las muestras en frascos Coplin dentro de una campana de flujo, siguiendo el tren de soluciones de la tabla 3:
- 34)Pasar 5 laminillas por vez, dejarlas a final del puente en alcohol al 70 % por no más de 90 min.
- 35)Lavar las laminillas con agua desionizada por un minuto.
- 36)Teñir por 5 minutos con hematoxilina.
- 37)Lavar las laminillas con agua desionizada corriente.
- 38)Teñir por 3 minutos con eosina.
- 39)Lavar las laminillas con agua desionizada corriente.
- 40)Deshidratar las laminillas siguiendo el tren de soluciones de la tabla 2.
- 41)Montar con resina suficiente cuidando de que no queden burbujas.
- 42)Observar al microscopio.

Solución	Tiempo
Etanol al 70% (1)	1 hora
Etanol al 70% (2)	1 hora
Etanol al 90% (1)	1 hora
Etanol al 90% (2)	1 hora
Etanol al 100% (1)	1 hora
Etanol al 100% (2)	1 hora
Xileno (1)	3 horas
Xileno (2)	3 horas

Tabla 2: Tren de soluciones para deshidratación: Esta tabla puede seguirse para casetes de biopsia o laminillas con muestras de tejido embebidas en parafina. Para los casetes de biopsia se realiza en frascos de vidrio de aprox. 600 mL de capacidad, para las laminillas esto se realiza en frascos Coplin de vidrio; para ambas muestras esto debe hacerse en campana de flujo laminar.

Solución	Tiempo
Xileno (2)	5 min
Xileno (1)	5 min
Etanol al 100% (2)	5 min
Etanol al 100% (1)	5 min
Etanol al 90% (2)	5 min
Etanol al 90% (1)	5 min
Etanol al 70% (2)	5 min
Etanol al 70% (1)	5 – 90 min

Tabla 3: Tren de soluciones para hidratación: Esta tabla puede seguirse para laminillas con muestras de tejido embebidas en parafina, las soluciones deberán colocarse en frascos Coplin de vidrio; esto debe hacerse en campana de flujo laminar.

11.1.2 Resultados

En la Figura 25 se observa en microscopía de campo claro un corte de 5 micras de intestino murino después de un lavado con EDTA 1mM, aún se observa epitelio en el tejido. En la Figura 26, después de dos lavados con EDTA 1mM, se observa que el intestino se ha desprendido de la mayor parte de células epiteliales. En la Figura 27, después de los lavados con EDTA 1mM y después de una digestión enzimática con colagenasa II y dispasa, aún es posible apreciar tejido y células dentro de él; después de la segunda digestión enzimática, la totalidad del intestino fue digerido.



Figura 25. Primer lavado con EDTA. Imagen representativa de muestras de intestino murino después de ser sometido a un lavado con EDTA 1mM. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 20x.

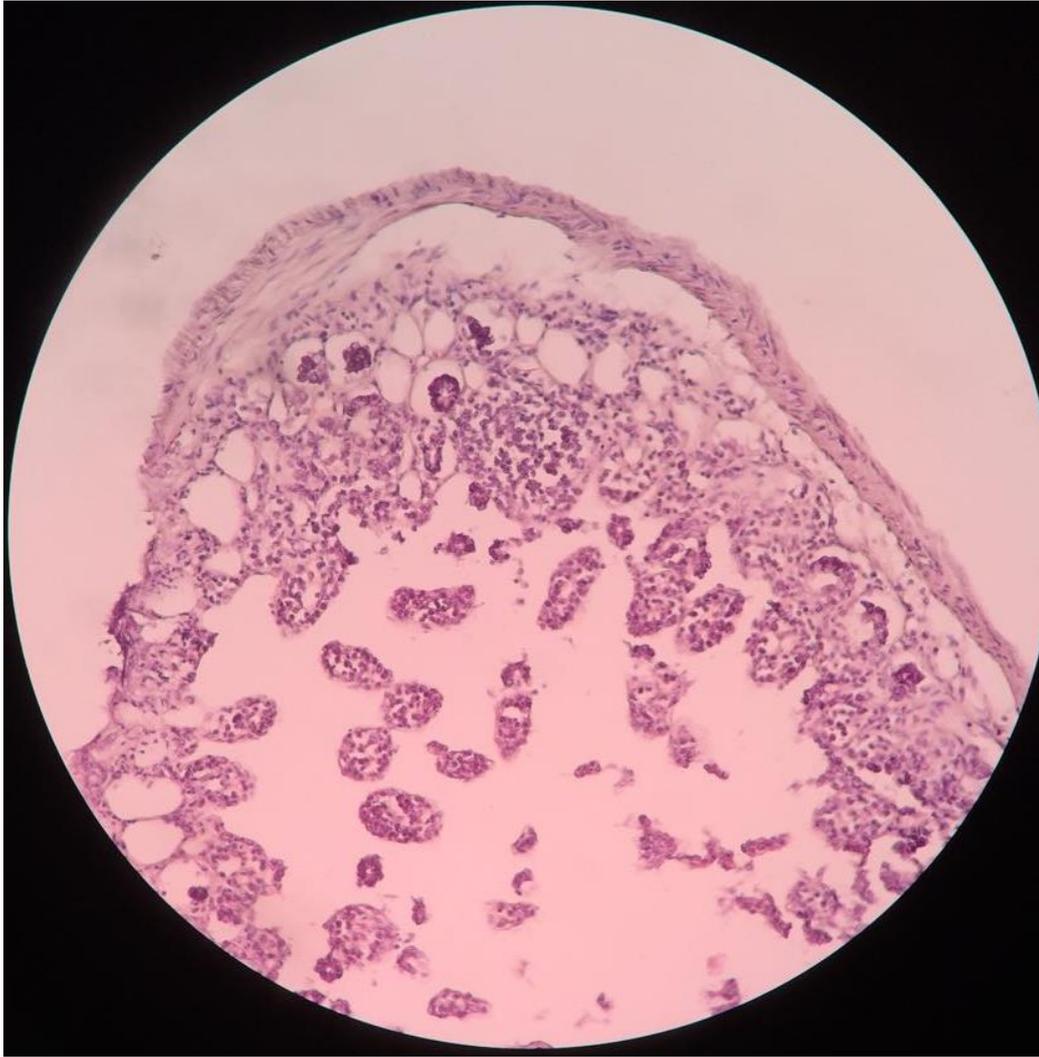


Figura 26. Segundo lavado con EDTA. Imagen representativa de muestras de intestino murino después de ser sometido a dos lavados con EDTA 1mM. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 20x.

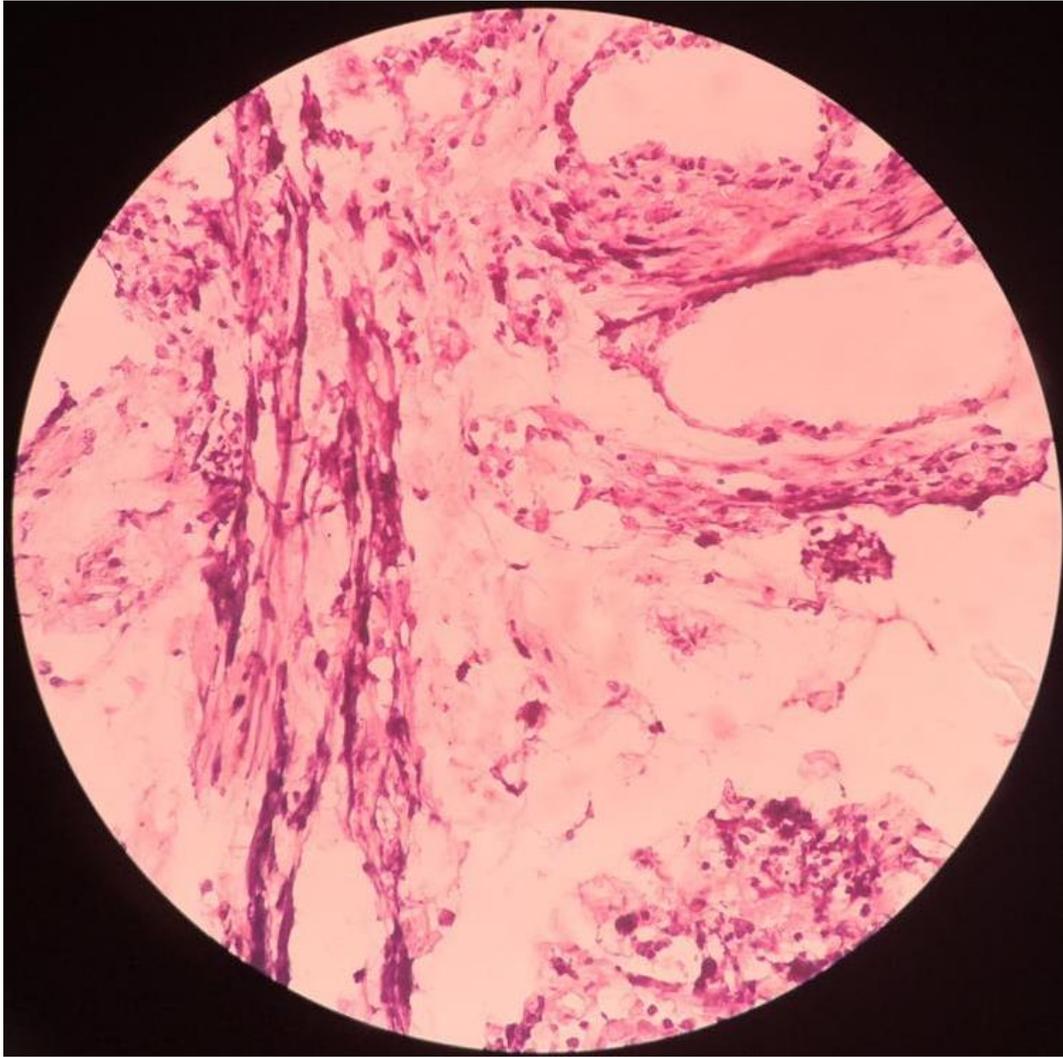


Figura 27. Digestión enzimática de intestino murino. Imagen representativa de muestras de intestino murino después de ser sometido a dos lavados con EDTA 1mM y a una digestión enzimática con colagenasa II y dispasa. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 20x. Después de la segunda digestión no quedaban muestras de tejido para procesar.