



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
PLASMÁTICAS EN TEJIDOS LINFOIDES DE RATÓN DURANTE
EL DESARROLLO POSTNATAL TEMPRANO**

Tesis que presenta

M. en C. Mariana del Carmen Orozco Uribe

Para obtener el Grado de

Doctorado en Ciencias

En la especialidad de Biología Celular

Directores de Tesis

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

COMITÉ TUTORAL

ASESORES

Dr. Guillermo Elizondo Azuela

Investigador 3E, Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN) Zacatenco. gazuela@cinvestav.mx.

Dr. Ricardo Félix Grijalva

Investigador 3E, Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN) Zacatenco. rfelix@cinvestav.mx

Dr. Emilio Fernando Navarro García

Investigador 3E, Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav-IPN) Zacatenco. enavarro@cinvestav.mx

ASESOR EXTERNO

Dr. Luis Donis Maturano

Profesor Investigador, Facultad de Medicina, Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). ludoma5@yahoo.com.mx

DEDICATORIA

“Nada tiene sentido en Biología si no es a la luz de la Evolución”

Theodosius Dobzhansky

A mi hija, Marion.

En memoria del Dr. Leopoldo Flores Romo, sus enseñanzas y legado vivirán para siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por otorgarme los recursos económicos para culminar este posgrado, con número CVU 419706 y al CINVESTAV por formar científicos de alto nivel.

Al Dr. Leopoldo Flores Romo, sin duda uno de los mejores inmunólogos de este país, por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, sin él, este proyecto no se hubiera concebido. Será para siempre recordado.

Al Dr. José Manuel Hernández Hernández y al Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete por su dirección para la culminación de este trabajo, por motivarme y permitirme llegar hasta aquí.

De igual manera, a mis asesores, Dr. Ricardo Félix Grijalva, Dr. Guillermo Elizondo, Dr. Fernando Navarro García, Dr. Luis Donis Maturano, por su participación y observaciones que enriquecieron la discusión de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 15, especialmente a Raúl, Felipe e Isis, por su ayuda técnica y sus observaciones para mejorar este proyecto. A la M.C. Juana Calderón Amador, por su colaboración científica. A todos ellos gracias por ser mi familia durante casi 10 años.

A Víctor Hugo Rosales del LaNSE-CINVESTAV por su valiosa asistencia técnica en citometría de flujo y a Yolanda Sánchez Chávez, por su asistencia técnica en el laboratorio.

A mi familia, que me ha mostrado su apoyo incondicional, sobre todo a mi esposo Samuel y a mi hija Marion, por impulsarme a ser una mejor persona y profesionista.

ABREVIATURAS

Abs: Anticuerpos

Ags: Antígenos

ASCs: Del inglés Antibody-secreting cells, Células Secretoras de Anticuerpos

BM: Del inglés Bone Marrow, Médula Ósea

CD: Del inglés Cluster of Differentiation, Cluster de diferenciación

Céls: Células

CG: Centro Germinal

Igs: Inmunoglobulinas

LC: Del inglés Light Chains, cadenas ligeras de las inmunoglobulinas

LcB: Linfocitos B

MLN: Del inglés Mesenteric Lymph Node, ganglio linfático mesentérico

MZ: Zona Marginal

PBs: Plasmablastos

PCs: Del inglés Plasma cells, Células Plasmáticas

Sp: Del inglés Spleen, bazo

V: Variable

ÍNDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.INTRODUCCIÓN	3
1.1 GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS	3
1.2 DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS B HACIA CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	4
1.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN PLASMÁTICA	8
1.4 INMUNOFENOTIPO DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS	10
1.5 SISTEMA INMUNE DEL NEONATO	12
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
4.1. OBJETIVO GENERAL:	16
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
6.MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS DE RATÓN Y PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES	18
6.2 FENOTIPIFICACIÓN DE LAS PCs DE RATÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO	18
6.3 ANÁLISIS DE LOS ISOTIPOS DE LAS INMUNOGLOBULINAS CITOPLÁSMICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	19
6.4 EVALUACIÓN <i>IN SITU</i> DE LOS ISOTIPOS DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LAS PCs MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA....	20
6.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POR ELISPOT	21
6.6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS Y SANGRE PERIFÉRICA DE DONADORES ADULTOS SANOS	21
6.7 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y SANGRE PERIFÉRICA DE ADULTOS SANOS.....	22
6.8 FENOTIPIFICACIÓN DE LAS PCs DE NEONATOS HUMANOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	23
7. RESULTADOS.....	23
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS.....	54
11. LITERATURA CITADA	55

12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	60
13. ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1 FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	7
FIGURA 2 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS.....	11
FIGURA 3 DIAGRAMA GENERAL DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL A SEGUIR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PCS DE RATONES NEONATOS.	17
FIGURA 4 DIAGRAMA GENERAL DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL A SEGUIR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PCS PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE NEONATOS HUMANOS RECÍEN NACIDOS.....	17
TABLA 1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE DE HUMANO.	22
FIGURA 5 CÉLULAS PLASMÁTICAS (PCS) CD138+CD98+ APARECEN DESDE TIEMPOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DEL RATÓN.	27
FIGURA 6 EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN BLIMP-1 EN PCS EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DEL RATÓN.	27
FIGURA 7 PCS NEONATALES PRESENTAN MARCADORES DE LCB (B220 Y CD19) Y DE PROLIFERACIÓN (KI67) EN LOS TEJIDOS LINFOIDES ANALIZADOS.....	29
FIGURA 8 DISTRIBUCIÓN DE PCS <i>IN SITU</i> Y ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS PCS INMUNOGLOBULINAS-POSITIVAS EN BAZO.	31
FIGURA 9 DISTRIBUCIÓN DE PCS <i>IN SITU</i> Y ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS PCS INMUNOGLOBULINAS-POSITIVAS EN MLN.	32
FIGURA 10 DISTRIBUCIÓN DE PCS <i>IN SITU</i> Y ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS PCS INMUNOGLOBULINAS-POSITIVAS EN BM.	33
FIGURA 11 PRESENCIA DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS (ASCS) EN TEJIDOS LINFOIDES DE NEONATOS A PARTIR DEL DÍA 1 DE VIDA.	35
FIGURA 12 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS DE CENTRO GERMINAL (GC, B220+ PNA+) EN NEONATOS DE 4 Y 7 DÍAS DE EDAD.	36
FIGURA 13 LA FRECUENCIA DE LAS PCS (CD138+ CD38+ BLIMP-1+) EN NEONATOS HUMANOS ES SIMILAR A LA DE LOS ADULTOS.	38
FIGURA 14 PCS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EXPRESAN PREFERENTEMENTE LA CADENA LIGERA LAMBDA (Λ) Y LOS ADULTOS PRESENTAN UNA MAYOR PROPORCIÓN DE LA CADENA LIGERA KAPPA (κ) EN LAS INMUNOGLOBULINAS.	40
FIGURA 15 XBP-1 SE EXPRESA EN PCS NEONATALES EN PROPORCIÓN SIMILAR A LOS ADULTOS	41
FIGURA 16 LAS PCS DE NEONATOS PRESENTAN UN FENOTIPO SIMILAR AL DE LOS ADULTOS.....	42
TABLA 2. FENOTIPO DE PCS EN NEONATOS Y ADULTOS.	42
FIGURA 17 LAS PCS DE NEONATOS Y ADULTOS PRESENTAN LIGERAS DIFERENCIAS EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR.	43
FIGURA 18 PCS EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA DE NEONATO Y ADULTO.	45

FIGURA 19 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN RATONES NEONATOS.	54
FIGURA 1S CONTROLES DE ISOTIPO DE INMUNOFLUORESCENCIA DE TEJIDOS DE RATÓN.	60
FIGURA 2S CÉLULAS CD138+ EN MUESTRAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL, PERO NO EN SANGRE PERIFÉRICA DE ADULTOS.	60

RESUMEN

Las células plasmáticas (PCs) son células terminalmente diferenciadas, provenientes de la activación de linfocitos B en respuesta a antígenos T-independientes o T-dependientes. La población de PCs es muy escasa en circulación de individuos no inmunizados, lo cual dificulta su estudio y la determinación de un fenotipo claro para identificarlas. Generalmente, se cree que los neonatos no son capaces de montar respuestas eficientes en contra de antígenos en las etapas tempranas de su desarrollo debido a la inmadurez de sus componentes inmunes, lo cual representa una desventaja, que es compensada a través de la protección que adquieren los neonatos de los anticuerpos de la leche materna. Sin embargo, esto implica que los neonatos sólo estarían protegidos contra los antígenos que la madre haya generado anticuerpos, dejándolos potencialmente susceptibles al resto de los antígenos. Este problema nos motivó a buscar PCs en suspensiones celulares de órganos linfoides de ratones neonatos, mediante citometría de flujo y en criocortes de tejido por inmunofluorescencia. De esta forma fuimos capaces de identificar una población de PCs desde el día 1 de edad de los neonatos, con los marcadores CD138 y CD98. Las PCs expresan el factor de transcripción Blimp-1, B220, CD19 y el marcador de proliferación Ki67; lo que sugiere que esta población está compuesta de plasmablastos y PCs en diferenciación. Determinamos que estas PCs (de neonatos en condiciones basales) secretan anticuerpos, principalmente IgM, desde el día 1 de edad. Nuestros resultados indican que los neonatos son capaces de producir sus propias células secretoras de anticuerpos en respuesta a los antígenos que se encuentran durante las primeras semanas de vida, provenientes de la comida, la microbiota colonizante o el ambiente.

ABSTRACT

Plasma cells (PCs) are terminally differentiated antibody-secreting cells, derived from activated B-lymphocytes in response to either T-independent or T-dependent antigens. Plasma cells population is very scarce in circulation in non-immunized individuals, which difficult their study and determination of the phenotype to identify them. It is generally believed that neonates are not capable of mounting an efficient response to antigens in their early stages of development, due to the immaturity of immune components but this disadvantage is well overcome through the antibodies neonates receive from mother's milk. However, this implies that neonates will be only protected against the antigens the mother had encountered in the past, leaving them potentially susceptible to the rest of the antigens. This issue motivated us to search for PCs in cell suspensions from neonate mice lymphoid organs, through flow cytometry and *in situ* in lymphoid organs cryosections through immunofluorescence. We were able to find and identify a population as PCs with two main markers CD138 and CD98, since day 1 after birth in neonates. These PCs were positive for Ki67 and expressed Blimp-1, B220, and CD19, which suggests the populations are plasmablasts and PCs with heterogeneous phenotypes. We also determined that these PCs are capable of secreting antibodies since day 1 in the analyzed organs, although mainly IgM isotype in basal conditions. Altogether, our results indicated that neonates are capable of producing their own antibody-secreting cells in response to antigens they encounter in the first weeks of life, most likely coming from food, colonizing microbiota or the environment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las Células Plasmáticas

La generación de anticuerpos (Abs) es una de las funciones más importantes de la respuesta inmune y es fundamental para brindar protección a los organismos [1-3]. Los anticuerpos son producidos por poblaciones celulares escasas de linfocitos B (LcB) terminalmente diferenciados, denominadas plasmablastos y células plasmáticas. La formación de células plasmáticas (PCs) y plasmablastos (PBs) se asocia con un cambio drástico en la morfología, en el perfil de expresión génica y en el tiempo de vida de éstas células comparadas con los linfocitos B de las cuales se originan, indicando su compromiso total hacia la síntesis de anticuerpos [2, 4]. De esta manera, las PCs son los efectores finales de la respuesta inmune humoral [5].

Como se mencionó anteriormente, las PCs son fácilmente distinguibles de los LcB maduros por su morfología. Los LcB maduros tienen una alta proporción núcleo/citoplasma, poseen poco retículo endoplásmico rugoso y un núcleo condensado; por el contrario, las células plasmáticas tienen un núcleo pequeño, denso y excéntrico, citoplasma voluminoso, abundante retículo endoplásmico rugoso y aumento del aparato de Golgi, relacionado con la síntesis y secreción elevada de proteínas [1].

Las PCs han sido estudiadas desde la década de los 50's debido a su papel en mieloma múltiple o enfermedades autoinmunes; sin embargo, para entender los mecanismos que median la inmunidad humoral se requiere de su estudio tanto en condiciones de enfermedad como en condiciones normales [5]. Existen pocos trabajos enfocados a elucidar el fenotipo de las células plasmáticas en individuos adultos sanos, lo cual probablemente se debe a la dificultad para aislar esta población celular en la periferia del organismo debido a su baja representación en circulación. Las células plasmáticas se encuentran en frecuencias muy bajas en sangre periférica de donadores sanos de alrededor de 2 células/ μ L y representan el $1.3\% \pm 1.4\%$ del total de los linfocitos B [6].

Generalmente, se utilizan indistintamente en la literatura los términos plasmablasto o célula plasmática para nombrar a las células productoras de Abs, no obstante, dichas poblaciones celulares presentan características fenotípicas y funcionales que las diferencian. Los PBs son células precursoras de las PCs que pueden derivar rápidamente de estimulación T-independiente o durante la etapa inicial de las respuestas T-dependientes. Estas células secretan inmunoglobulinas por periodos cortos de tiempo antes de morir por apoptosis, usualmente residen en los tejidos linfoides secundarios en los cuales son generados y mantienen su capacidad proliferativa; además de que son migratorias. Los PBs se encuentran comúnmente en el torrente sanguíneo emigrando a órganos tales como la médula ósea o el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) donde pueden permanecer durante un periodo variable de tiempo, dependiendo de las señales que reciba en estos sitios [1, 7-9].

Las PCs son células terminalmente diferenciadas no proliferantes o quiescentes que resultan de una reacción de centro germinal (GC) T-dependiente en los folículos de los órganos linfoides y se caracterizan por secretar grandes cantidades de anticuerpos [7]. Las PCs no se encuentran normalmente en circulación, sino que permanecen como residentes en ciertos órganos donde poseen su nicho, principalmente la médula ósea [7]. El tiempo de vida de las PCs varía desde pocos días a meses o incluso, años [10]. Las PCs secretoras de IgM formadas durante una respuesta primaria, con frecuencia sobreviven sólo unos pocos días y mueren por apoptosis *in vivo* [5], probablemente como resultado del estrés que sufre el retículo endoplásmico por la producción masiva de anticuerpos [8], por ello son llamadas *células plasmáticas de vida corta*. Las *células plasmáticas de vida larga* se encuentran principalmente en la médula ósea [11], aunque también pueden localizarse en el bazo [12], y secretan inmunoglobulinas por largos periodos de tiempo [7].

1.2 Diferenciación de Linfocitos B hacia Células Plasmáticas

Los linfocitos B se desarrollan en hígado fetal y en adultos, en médula ósea, a partir de las células progenitoras hematopoyéticas. Los linfocitos B inmaduros, caracterizados por la expresión de IgM e IgD en la membrana, abandonan la médula ósea para diferenciarse en

las diferentes subpoblaciones de linfocitos B, las cuales difieren en su localización y sus requisitos de activación [8, 13].

Los linfocitos B maduros se pueden clasificar en tres subpoblaciones principales: linfocitos *B foliculares o B2*, *linfocitos B de zona marginal (MZ)* y *linfocitos B1*. Los linfocitos B2 son la subpoblación predominante y se localizan en los folículos linfoides del bazo y de los ganglios linfáticos. En contraste, los linfocitos BMZ se encuentran en los senos marginales del bazo, región localizada entre la pulpa roja y la pulpa blanca, donde se localizan de forma estratégica para encontrarse con los patógenos o antígenos derivados de la circulación sanguínea. Los linfocitos B1 se identifican por su expresión única de proteínas de superficie y su capacidad de auto regeneración; se encuentran principalmente localizados en las cavidades pleurales y peritoneales, así como en sitios de mucosas, lo cual facilita la vigilancia de los tejidos que son más susceptibles a patógenos ambientales [5]. La localización anatómica de los linfocitos B1 y los de zona marginal les permite responder rápidamente a antígenos T-independientes, tales como componentes bacterianos. En cambio, los linfocitos B2, responden principalmente a antígenos T-dependientes de composición proteica [2, 8, 13].

Los linfocitos B1 y BMZ son las primeras células en responder frente a un antígeno generando una respuesta de anticuerpos temprana [5]. Las reacciones en las que participan los linfocitos B1 y BMZ son conocidas como *respuestas extrafoliculares*; en las cuales el linfocito B recibe una señal dependiente del receptor de antígeno, que genera el desarrollo de linfoblastos que se dividen (pueden llevar a cabo recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas (CSR) [14]) y se diferencian hacia plasmablastos de vida corta que secretan anticuerpos. Esta reacción extrafolicular es la fuente de la mayor parte de anticuerpos protectores que se producen durante una respuesta primaria, aunque la afinidad de estos anticuerpos es moderada e invariable [2]. Los linfocitos B1 secretan anticuerpos naturales que proveen inmunidad en las mucosas y producen IgA en respuesta a las bacterias comensales en el intestino [5]; mientras que las células plasmáticas derivadas de linfocitos BMZ, generalmente secretan IgM de baja afinidad y sobreviven alrededor de 3 días, sufriendo apoptosis *in situ*, posiblemente debido a la desregulación de la molécula

apoptótica Bcl-2 homóloga A1 [15]. Aunque estudios recientes encontraron la presencia de PCs de vida larga IgM-positivas que reconocen bacterias de la microbiota comensal [16]. Sin embargo, después de su activación con antígenos T-dependientes, los linfocitos BMZ pueden desplazarse a los folículos para participar en reacciones de centro germinal, previo a su diferenciación final hacia células plasmáticas [5] (Figura 1A).

En una respuesta folicular los linfocitos B2 activados por antígenos de tipo T-dependientes reingresan en los folículos de linfocitos B y, bajo la influencia de linfocitos T cooperadores foliculares especializados, proliferan vigorosamente para formar un centro germinal. Los *centros germinales* (GCs) son sitios de proliferación masiva localizados en los folículos de órganos linfoides secundarios [17], donde se lleva a cabo una selección basada en los receptores de antígeno cuya afinidad ha sido modificada mediante hipermutación somática y donde ocurre la recombinación de cambio de clase (CSR, *class-switch recombination*) de las inmunoglobulinas. Linfocitos T cooperadores antígeno-específicos y las células dendríticas foliculares (FDCs) son importantes para la respuesta de centro germinal. Las FDCs capturan a los antígenos en el centro germinal y los receptores de complemento (CD21 y CD35) expresados en las FDCs son cruciales para cumplir esta función. La reacción de centro germinal tiene un pico máximo entre los 10 y 14 días posteriores a la inmunización [13]. Típicamente, la reacción de centro germinal da como resultado células plasmáticas de vida larga que producen anticuerpos de alta afinidad y con cambio de isotipo, que reconocen antígenos de naturaleza proteica, así como linfocitos B de memoria cuyas características fenotípicas y funcionales son más semejantes a las de un linfocito B maduro [2] (Figura 1B).

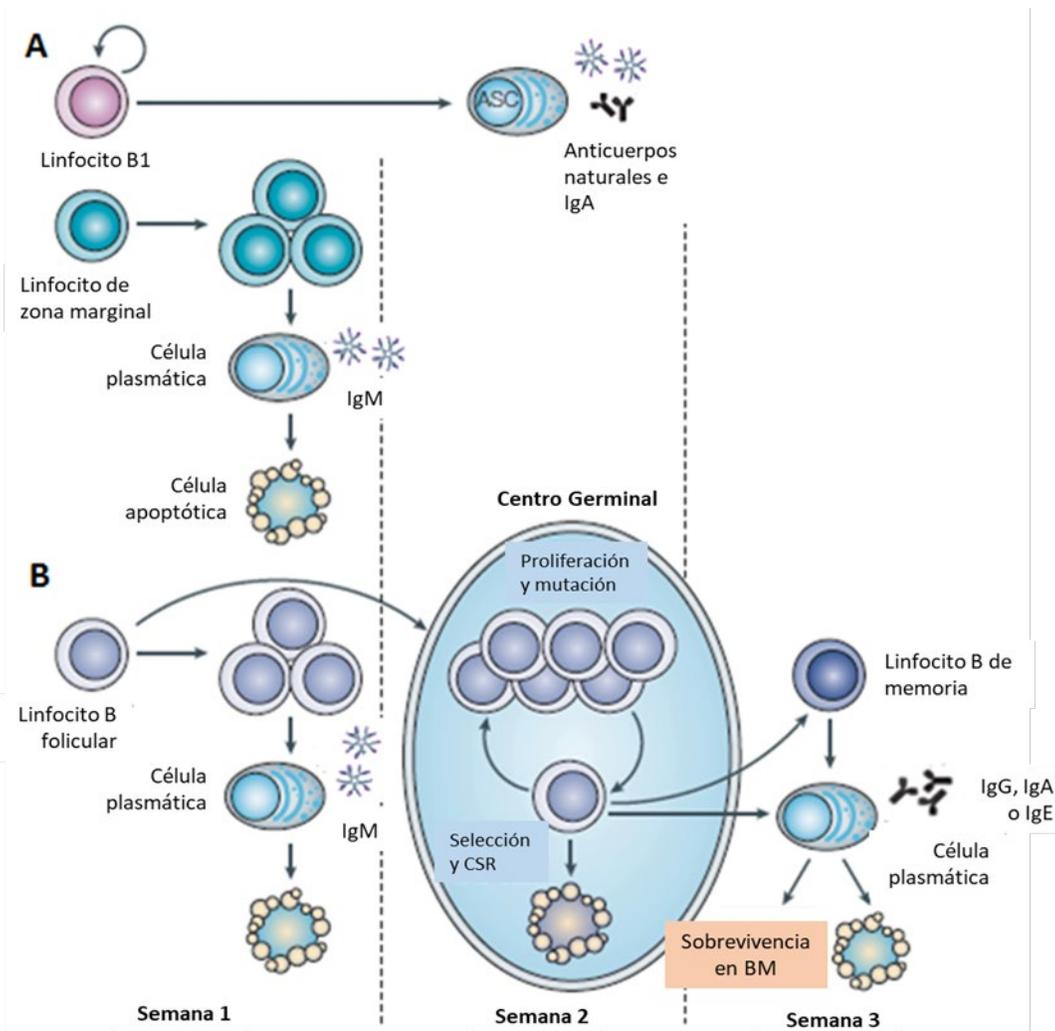


FIGURA 1 | Formación de las células plasmáticas. (A) Las células productoras de anticuerpos (ASCs) formadas a partir de linfocitos B1 secretan anticuerpos naturales. Los linfocitos B (LcB) de zona marginal (BMZ) se diferencian a PCs cuando se encuentran con un antígeno extraño. (B) Los LcB foliculares (B2) activados pueden llevar a cabo una reacción extrafolicular y secretar Abs en una respuesta temprana; o bien, pueden entrar en reacción de centro germinal que dará lugar a LcB de memoria y PCs de larga vida con hipermutación somática y cambio de isotipo. CSR, *Class switch recombination*. Modificado y traducido de Shapiro-Shelef & Calame (2005).

Es posible que las células de memoria que salen del CG progresen a PCs en una sola vía o bien, que las células que salen del CG continúen su ruta de diferenciación ya sea hacia linfocito B de memoria o hacia PCs. Existe una población celular única (BCR+CD79b+B220-CD138-) en la médula ósea que se ha descrito como células de memoria “pre-plasmáticas”; estas células se diferencian a PCs durante el segundo encuentro con el antígeno; sin embargo, esta población no está bien definida. También se han descrito células en médula

ósea (BCR⁺B220^{low}CD138⁺CD44⁺) que se pueden diferenciar a células plasmáticas independientemente de su encuentro con un antígeno [13]. Los PBs pueden desarrollarse a partir de cualquier tipo de linfocito B activado- incluyendo naive, BMZ, B2, de centro germinal y de memoria- pero no está claro si los PBs de todos estos orígenes tienen la capacidad de convertirse en plasmáticas de vida larga [8].

1.3 Factores de transcripción involucrados en la diferenciación plasmacítica

Un intrincado programa molecular dirige la transición y el compromiso de las células plasmáticas. La diferenciación terminal de los LcB hacia PCs está bajo el control de diversos factores de transcripción. Los factores claves para iniciar la diferenciación hacia una célula productora de anticuerpos son la expresión de *Blimp-1*, *XBP-1*, *IRF4* y la desregulación de los productos tempranos de los genes asociados al linaje de células B por la represión de los factores de transcripción reguladores *SPIB*, *BCL6* y *PAX5* [1, 5, 8]; además se requiere la presencia de interleucina-21 (IL-21) [18] e IL-10 [19].

El represor transcripcional Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*), codificado por el gen *Prdm1*, es reconocido como regulador maestro de la diferenciación de las células plasmáticas [20]. Sin embargo, se ha reportado que Blimp-1 es prescindible para el inicio de la diferenciación hacia células plasmáticas (para este proceso es crucial la represión de Pax-5), aunque es esencial para conducir a la manifestación del programa transcripcional completo y para la producción de altos títulos de anticuerpos [21]. La expresión de la proteína Blimp-1 resulta en una represión concomitante de factores de transcripción y sobrevivencia específicos de linfocitos B, como *BCL-6* y *PAX-5* (*Paired box protein-5*), la proteína del ciclo celular *c-myc*, el gen de presentación de antígeno *CIITA* (necesario para la síntesis del MHC de clase II) y las moléculas de señalización del BCR *Spi-B* e *Id3*. Blimp-1 indirectamente incrementa la expresión del mRNA de la cadena-J y la síntesis de Syndecan-1 [1, 5]. Blimp-1 suprime la expresión de dos factores de transcripción necesarios para la reacción de centro germinal –Bcl-6 y Pax5- asegurando así que, después de inducirse el desarrollo de PCs, los LcB no puedan regresar a una etapa previa de diferenciación [13] (Figura 3). Trabajos *in vivo* demuestran que Blimp-1 se expresa en todas

las PCs, incluyendo aquellas que se generaron a partir de una respuesta primaria por un antígeno T-independiente o T-dependiente, aquellas formadas durante una respuesta secundaria provenientes de la diferenciación de un linfocito B de memoria y de PCs de vida larga de médula ósea. Se expresa también en una subpoblación del 5-15% de linfocitos B de centro germinal, pero no se encuentra en linfocitos B de memoria [5].

XBP-1 (*X-box binding protein*) fue el primer factor de transcripción que se demostró que era indispensable para la diferenciación plasmacítica. XBP-1 actúa río abajo de Blimp-1 y aparentemente es crucial para la secreción de anticuerpos [13, 22-24]. En líneas celulares de LcB y en LcB esplénicos, XBP-1 induce la expresión de genes que están involucrados en el direccionamiento de proteínas al retículo endoplásmico, en la translocación hacia el retículo endoplásmico, plegamiento de proteínas, degradación de proteínas mal plegadas, glicosilación de proteínas, tráfico retículo endoplásmico-aparato de Golgi, tráfico en la vía endosomal y en el direccionamiento de las vesículas secretorias hacia la membrana plasmática [22]. Además, XBP-1 incrementa la masa y el funcionamiento de las mitocondrias, el tamaño del retículo endoplásmico y tamaño de la célula en general [13].

PAX5 (*Paired box protein 5*) fue identificado por primera vez como un homólogo a la proteína TSAP encontrada en el erizo de mar; se une al DNA por un dominio pareado bipartita y puede funcionar tanto como represor, o como activador transcripcional. PAX5 es crítico para el compromiso y mantenimiento del linaje de linfocitos B [5] y debe ser reprimido para permitir la diferenciación hacia PCs. PAX5 activa genes blancos que son importantes para los LcB, incluyendo $Ig\alpha$, CD19, CD21, BLNK (*B-cell linker*) y AID (*Activation-induced cytidine deaminase*). Además, la represión mediada por PAX5 provee un mecanismo por el cual se bloquea la diferenciación de las PCs, al reprimir la expresión de XBP-1, de IgH, de IgL y la cadena J de las inmunoglobulinas [2, 3, 13].

Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*) se expresa ubicuamente a niveles bajos pero se encuentra sobreexpresado centros germinales y es requerido para la formación de los mismos [5]. Una función muy importante de este factor de transcripción es reprimir la expresión de Blimp-1. Bcl-6 bloquea la expresión de Blimp-1 interfiriendo con los activadores transcripcionales

de AP-1 y uniéndose a un sitio en el intrón 5 de *Prdm1* (*positive-regulatory-domain containing 1*) [13].

1.4 Inmunofenotipo de las Células Plasmáticas

Numerosas proteínas de superficie cambian durante la diferenciación de las PCs: el complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II), B220/CD45, CD19, CD21, CD22 y CXCR5 disminuyen, mientras que Syndecan-1 (CD138) incrementa su expresión. La pérdida de CD19, CD21, CD22 y CD45, todos ellos moduladores de la señalización a través del BCR, es consistente con la ausencia del BCR en las células plasmáticas. Syndecan-1, un proteoglicano que reconoce la matriz extracelular y factores de crecimiento, está presente en las células B secretoras de anticuerpos y comúnmente es usado como marcador de PCs. Sin embargo, Syndecan-1 también se encuentra en una subpoblación de células B de centro germinal que probablemente son PBs o células comprometidas a convertirse en PCs. CD38, o ADP-ribosil-ciclasa, es una molécula pleiotrópica expresada en linfocitos T y B activados y células NK; actúa como receptor, molécula de adhesión y señalización que reconoce el ligando CD31, ectoenzima y es frecuentemente utilizado como marcador de activación. Las PCs terminalmente diferenciadas y sus contrapartes patológicas, son las células que expresan la mayor densidad de superficie de esta molécula, entre las células humanas [25, 26]. El MHC de clase II, requerido para la presentación de antígeno a las células T, no se encuentra en la superficie de las PCs porque éstas no requieren de las señales provenientes de las células T; no obstante, se encuentra elevado en PBs, lo que probablemente refleja la transición de LcB hacia PC. VLA-4 es la integrina más predominante en las PCs, es importante para el contacto célula-célula entre las PCs y las células estromales de la médula ósea [9] (Figura 2).

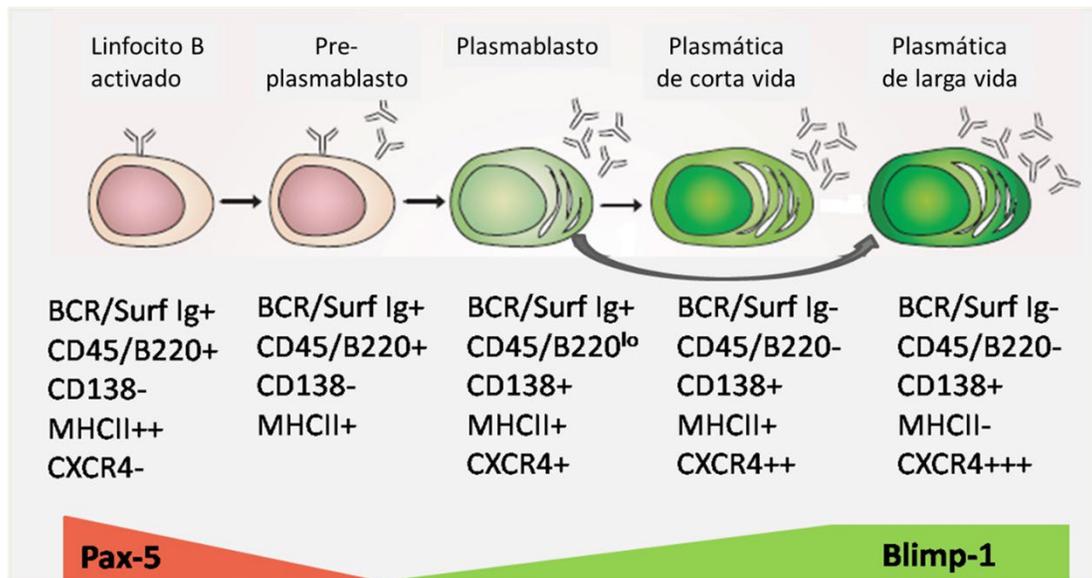


FIGURA 2| Expresión de marcadores de superficie y factores de transcripción durante el desarrollo de células plasmáticas. Modificado de Oracki et al. 2010.

Algunos receptores de quimiocinas, integrinas y carbohidratos que se unen a selectinas son importantes para determinar la capacidad de las PCs de abandonar los centros germinales y posteriormente migrar hacia la médula ósea, a las mucosas o a los sitios de inflamación. CXCR4 es crucial para el direccionamiento de las PCs hacia la pulpa roja del bazo, a los cordones medulares de los ganglios linfáticos y a la médula ósea, en donde se expresa su ligando CXCL12; mientras que la reducción de CXCR5 y CCR7 en las células post-centro germinal permite su salida de los folículos [8, 13]. PBs tanto de ratón como de humano que migran hacia la médula ósea expresan CXCR3 que se une a CXCL9, además, CXCR6 y su ligando CXCL16 también son receptores de quimiocinas importantes en el direccionamiento de las células plasmáticas. Los análisis de microarreglos mostraron que Blimp-1 inhibe la expresión de CXCR5 e induce la expresión de CXCR4 y de la integrina- α 4, favoreciendo la salida de PCs de los folículos y su migración hacia médula ósea o hacia las mucosas [13].

Pocos trabajos se han dedicado a tratar de definir el fenotipo de las PCs, debido a la frecuencia tan baja de estas células en sangre periférica de individuos adultos sanos. Medina y colaboradores (2002) [4] reportan tres fenotipos diferentes dependiendo de la localización de las PCs; en órganos linfoides secundarios son CD19⁺ CD20^{low} CD22⁺ CD45⁺

HLA-DR⁺ VS38c⁺ CD138^{-/low}; mientras están en circulación sanguínea pierden por completo la expresión de CD20, CD22 y tienen una expresión intermedia de CD138; aquellas células encontradas en médula ósea presentan una expresión intermedia de CD19, CD45 y HLA-DR, además incrementan considerablemente la expresión de VS38c y CD138. De esta manera, sugieren que las PCs atraviesan un proceso de transición desde que se originan en los órganos linfoides secundarios, como las amígdalas, pasan a la sangre y finalmente se depositan en la médula ósea; donde ciertas moléculas disminuyen gradualmente, mientras que otras van aumentando conforme ocurre el proceso de maduración. Caraux y colaboradores (2010) [6], reportaron un estudio realizado con una cohorte de 106 individuos sanos donde pudieron identificar de manera sistemática y de acuerdo a su inmunofenotipo, 4 subpoblaciones de LcB en sangre periférica: LcB inmaduros (CD10⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ CD38⁺), LcB naive (CD10⁻ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ CD38⁻), LcB de memoria (CD10⁻ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ CD38⁻) y PCs (CD10⁻ CD19⁺ CD20⁻ CD27⁺⁺ CD38⁺⁺). Las PCs que identificaron presentaron características de tamaño y granularidad mayores comparadas con las demás subpoblaciones, presentaron inmunoglobulinas citoplásmicas (cylg) y una positividad heterogénea para CD138 (57+/- 12% células CD138⁻ y 43 +/-12% células CD138⁺) [6]. Por su parte, Paiva *et al.* en 2010 [27] evaluaron diferentes marcadores en PCs de sangre y médula ósea, para su comparación posterior con PCs procedentes de pacientes con enfermedades relacionadas a esta población celular, como el mieloma múltiple. En este estudio reportan que las PCs son CD19⁺ CD20⁻ CD27^{+/hi} CD38^{+/hi} CD138⁺ con una tendencia a incrementar la expresión de CD38 y CD138 en las PCs de médula ósea.

1.5 Sistema inmune del neonato

El sistema inmune del neonato ha sido objeto de estudio de la inmunología durante largo tiempo, sin embargo, la evidencia acerca de la madurez y eficiencia de este sistema para responder ante estímulos antigénicos externos es contradictoria. Debido a que la etapa neonatal representa un periodo de transición para el sistema inmune, presenta varios problemas inusuales; por una parte debe ser capaz de mantenerse en el cuerpo de la madre sin ser reconocido como extraño y evitar ser rechazado por el huésped; a la vez que debe estar preparado para enfrentar la gran variedad de estímulos antigénicos a los cuales estará

expuesto al nacer, y que representan un riesgo severo de infecciones principalmente bacterianas y fúngicas si el neonato no cuenta con un sistema inmune competente [28]. Las diferencias aparentemente más importantes que se han encontrado entre el sistema inmune neonatal y el del adulto, son una reducción en la reserva de precursores granulocíticos en la médula ósea, una reducción en la actividad del complemento presente en el suero y un incremento en la población de linfocitos T con fenotipo naive [29].

Existen varios reportes que muestran la incapacidad del sistema inmune del neonato para responder adecuadamente ante estímulos antigénicos al momento de nacer. La mayoría de los anticuerpos que se encuentran en el neonato son transmitidos por la madre a través de transferencia placentaria; sin embargo, estos anticuerpos se limitan al isotipo IgG, son catabolizados rápidamente y tienen una vida media de 20 días, lo que confiere una protección restringida al recién nacido [29]. Se ha observado que los LcB aislados del cordón umbilical de neonatos humanos, cuando son cultivados *in vitro*, son capaces de producir inmunoglobulinas (Igs) en respuesta a un estímulo T-independiente como el virus de Eipstein-Barr (EBV) pero no a un estímulo policlonal T-dependiente como el provocado por el mitógeno *pokeweed* (PWM, hierba carmín) [30]. Además, la cantidad de células secretoras de anticuerpos (ASCs) que generan, es menor comparada con las de individuos adultos y la clase de Igs que secretan es casi exclusivamente de tipo IgM; a pesar de que poseen LcB que expresan IgG o IgA en su superficie en proporción similar a los adultos [28, 30-34]. Estas deficiencias funcionales pueden deberse al defecto en la cooperación con los linfocitos T neonatales, que presentan un fenotipo más supresor, o debido a que se ha encontrado que los linfocitos T neonatales tienen una producción reducida de IL-4 y una expresión reducida del ligando de CD40, importantes para la secreción de Igs y para el cambio de clase de las Igs, respectivamente [30, 32, 35]. Por otra parte, también se ha demostrado que los LcB del neonato son capaces de responder a estímulos antigénicos como CpG-oligodeoxinucleótidos (CpG-ODN), un agonista de la activación de TLR-9, activándose y proliferando cuando son expuestos a este reto antigénico [36]. Además, se ha observado que los linfocitos B provenientes de neonatos nacidos prematuramente pueden hacer cambio de clase y llevan a cabo reacciones de centro germinal, aunque el

repertorio que poseen es limitado comparado con el del adulto, esto en respuesta a antígenos ambientales [37].

Para la producción de la diversidad necesaria, así como para la generación de anticuerpos neutralizantes y de alta afinidad contribuyen múltiples mecanismos, entre ellos, el uso preferencial de segmentos génicos particulares de línea germinal, recombinación de segmentos V(D)J e hipermutación somática en LcB estimulados por antígeno. Dichos mecanismos también han sido evaluados durante la respuesta neonatal, aunque los resultados son controvertidos. Algunos estudios sugieren que el repertorio de LcB periféricos de infantes jóvenes está sesgado en el uso de segmentos génicos [38, 39], en la longitud de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) y en el grado de mutación somática que presentan las inmunoglobulinas en comparación con el de los adultos, siendo el CDR3 más reducido en longitud y presentándose poca mutación somática [40-44]. Por su parte, se ha observado que la mayor parte de los linfocitos B del neonato pertenecen a la subpoblación CD5+, que en adultos está asociada con Abs de baja afinidad, con reactividad cruzada o autorreactivos, y que están restringidos al isotipo IgM; la incapacidad de producir otros isotipos de Igs podría estar relacionada con un déficit en la cadena de eventos que llevan a la generación de memoria y a la producción de Abs de alta afinidad y con cambio de clase [45].

Sin embargo, otros estudios sugieren que los infantes son capaces de montar respuestas de anticuerpos similares a las de los adultos [46, 47]. Kolar y colaboradores en 2004, mostraron que el repertorio producido a partir de progenitores linfocitarios provenientes del cordón umbilical o de adulto son similares, particularmente una vez que la IgM se expresa en la membrana de las células, el uso de los segmentos VH y JH son casi idénticos, aunque presentan algunas diferencias en la longitud del CDR3 [46]. Además, Prabakaran y colaboradores 2012, concluyen que el repertorio de IgM en neonatos es comparable con el del adulto, ya que presentan una diversidad de uso de genes y una longitud del CDR3 similares, a pesar de que difieren en el uso de ciertos genes, en rearreglos V(D)J, en diversidad de unión y en mutación somática [48]. En nuestro grupo de trabajo se analizó la estructura de los ganglios linfáticos y la formación de centros germinales posterior a la

inmunización de ratones al nacimiento, con un antígeno modelo (DNP-KLH); encontrándose que la red de células estromales fibroblásticas reticulares (FRCs), importantes para la organización y compartimentalización de las poblaciones celulares en el ganglio y para dirigir el tráfico de células y antígenos, se reorganiza rápidamente en los neonatos inmunizados y se observa la formación de centros germinales a los 14 días post-inmunización, lo cual demuestra la capacidad en los neonatos para montar respuestas inmunes después de haber sido inmunizados al nacimiento, aunque esta respuesta está un poco desfasada y es de menor intensidad que en los individuos adultos [49].

2. JUSTIFICACIÓN

Hasta la actualidad se ha pensado que los neonatos e infantes tienen un sistema inmune inmaduro, incapaz de montar respuestas inmunes efectivas y que necesitan adquirir elementos protectores a través de inmunidad pasiva; sin embargo, poco se sabe realmente de la función del sistema inmune de los recién nacidos y en particular, de las células responsables de producir los anticuerpos.

Las células plasmáticas (PCs) son células terminalmente diferenciadas, no proliferantes cuya función principal es la secreción de anticuerpos, contribuyendo así a la inmunidad humoral. Estas células son muy escasas en circulación y en tejidos linfoides, lo que dificulta su estudio aún en individuos adultos. Es por ello que el principal objetivo del presente trabajo fue buscar esta población celular de PCs en etapas tempranas del desarrollo de los ratones neonatos, además de evaluar sus características fenotípicas y su función secretoria, bajo condiciones basales.

3. HIPÓTESIS

Las células plasmáticas se encuentran presentes en tiempos tempranos del desarrollo neonatal del ratón y sus funciones son iguales que en adultos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

- Identificar y caracterizar a las Células Plasmáticas (PCs) en tejidos linfoides de ratones C57/BL-6 sanos durante su desarrollo postnatal temprano.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Identificar mediante citometría de flujo a las PCs (CD138+ CD98+) provenientes de bazo (Sp), ganglio linfático mesentérico (MLN) y médula ósea (BM) de ratones neonatos a los días 1, 4, 7 y 14 de edad en estado basal.
2. Evaluar la expresión de marcadores (Blimp-1, B220, CD19, Ki67) en PCs provenientes de Sp, MLN y BM de ratones neonatos a los días 1, 4, 7 y 14 de edad, por citometría de flujo.
3. Analizar los isotipos de las Igs citoplásmicas presentes en PCs en los tejidos linfoides de ratones neonatos, tanto por citometría de flujo como *in situ*, por inmunofluorescencia.
4. Evaluar la secreción de anticuerpos en PCs mediante ensayos de ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*) en tejidos linfoides de ratones neonatos.
5. Identificar y caracterizar PCs (CD138+ CD38+ Blimp-1+) de sangre de cordón umbilical de neonatos humanos sanos por citometría de flujo.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

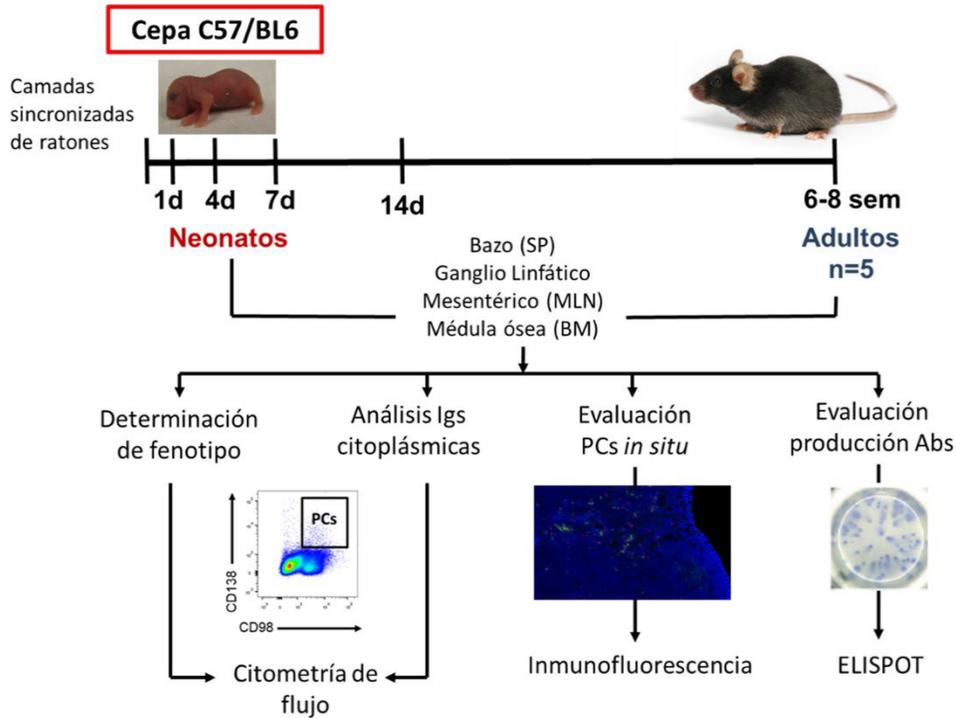


FIGURA 3 | Diagrama general de la estrategia experimental a seguir para la identificación y caracterización de PCs de ratones neonatos.

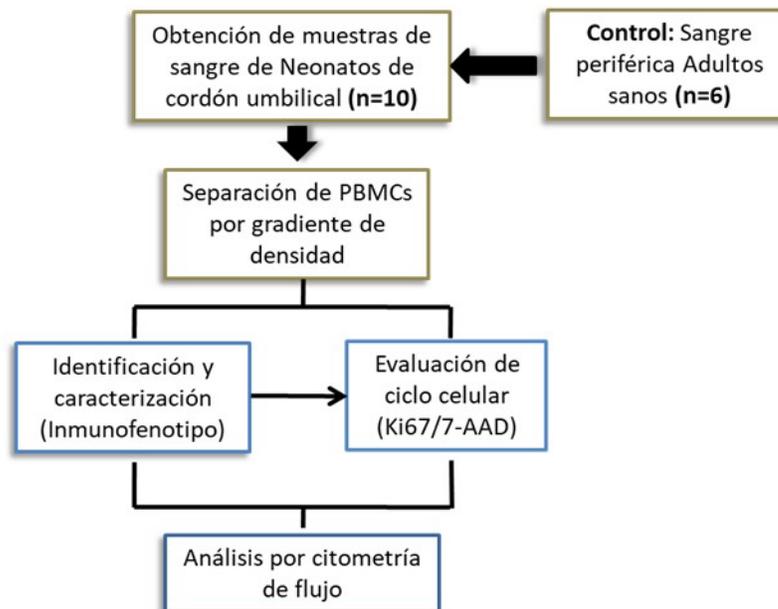


FIGURA 4 | Diagrama general de la estrategia experimental a seguir para la identificación y caracterización de PCs provenientes de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos humanos recién nacidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de los tejidos de ratón y preparación de suspensiones celulares

Ratones neonatos de la cepa C57/BL6 de las diferentes edades evaluadas (día 1, día 4, día 7 y día 14) fueron obtenidos mediante cruce sincronizada de ratones adultos en el UPEAL-CINVESTAV siguiendo las indicaciones ordenadas por la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999, de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Una vez obtenidas las camadas de neonatos, los animales fueron sacrificados por decapitación y los órganos de interés fueron extraídos: bazo (Sp), ganglio linfático mesentérico (MLN) y médula ósea (BM). Como control fueron utilizados ratones machos adultos de 6 a 8 semanas de edad. Para obtener las suspensiones celulares de bazo y médula ósea, se colocaron los órganos en PBS 1x, los tejidos se disgregaron con ayuda de una jeringa y se filtraron con un filtro de 0.22 μm . En el caso del bazo, fue necesario realizar una lisis de eritrocitos, usando un buffer de carbonatos (NH_4Cl 8.3 g KHCO_3 1 g EDTA 37 mg en 1 L de PBS 1x). La médula ósea de la tibia y fémur de los ratones, fue extraída cuidadosamente con ayuda de una jeringa hipodérmica de 1 mL y una aguja para insulina para tratar de obtener la médula ósea íntegra (adultos), o una vez obtenidos los huesos, se trituraron con ayuda del émbolo de una jeringa para extraer el tejido (neonatos). El tejido proveniente de ganglio linfático mesentérico fue sometido a una digestión enzimática con una solución de 0.150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Colagenasa tipo II (Gibco, ThermoFisher Scientific, Cat. 17101-015) y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNasa tipo I libre de RNasa (Boehringer Mannheim Corp., Cat 776-785) en RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino. Previamente, el tejido fue incubado de 20-40 min a 37 °C, disgregado, lavado con PBS 1x y filtrado con un filtro de 0.70 μm .

6.2 Fenotipificación de las PCs de ratón por citometría de flujo

Se obtuvieron las suspensiones celulares de los diferentes órganos de ratón y de diferentes individuos se juntaron en un *pool*, dependiendo de la edad de los mismos, con la finalidad de obtener suficientes células para realizar las tinciones, como se describió anteriormente. Se colocaron de 1×10^5 - 10^6 de células por tubo y se les añadieron 100 μL de Bloqueador Universal 1x (BioGenex, Fremont, CA, USA; Cat. HK085-5K), incubando por 10 min. Una vez

transcurrido el tiempo de incubación se lavaron con PBS 1x con BSA 0.2% y se centrifugaron a 1,200 rpm por 5 min en una centrífuga Sorvall ST40R (Thermo Scientific, Cat. 10107934). Posteriormente, se añadieron los anticuerpos para el marcaje extracelular de moléculas de identificación de las PCs y se incubaron por 20 min a 4°C. La población de PCs se identificó como lo propusieron Tellier and Nutt [50], con los anticuerpos monoclonales: anti-CD138-PE y anti-CD98-BV421 mientras que los anticuerpos utilizados para caracterización fueron los siguientes: anti-Blimp-1-purificado, anti-CD19-PECy5, anti-B220-FITC, anti-Ki67-purificado. Para la tinción intracelular de Blimp-1 y Ki67 las células fueron tratadas con 100 µL de solución de fijación/permeabilización (eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Buffer Set, ThermoFisher Scientific, Cat. 00-5523) por 2 horas a 4 °C; posteriormente fueron lavadas con 300 µL de buffer de permeabilización en una dilución 1x en agua destilada (eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Buffer Set, ThermoFisher Scientific, Cat. 00-5523) y se les añadieron los anticuerpos correspondientes incubando por 40 min; después, fueron lavadas nuevamente con el buffer de permeabilización y se les añadieron los anticuerpos secundarios anti-rata-Alexa Fluor 594 y anti-conejo-Alexa Fluor 488, incubando por 25 min; finalmente fueron lavadas y fijadas con 350 µL de PFA 1% (Paraformaldehído en polvo 95%, Sigma Aldrich, Cat. SIG-58127). Se adquirieron de 200,000 – 400,000 eventos por muestra en el citómetro de flujo BD LSRFortessa™ Special Order Research Product (BD Biosciences). El análisis de los datos se ejecutó con el programa FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star, Inc). La lista detallada de los anticuerpos empleados para esta metodología se encuentra en la tabla 1 de la sección de Anexos.

6.3 Análisis de los isotipos de las inmunoglobulinas citoplásmicas por citometría de flujo

A partir de las suspensiones celulares obtenidas, se realizaron tinciones intracelulares utilizando el Kit de fijación/permeabilización (BD CytoFix/CytoPerm, BD Biosciences, Cat. 554714), siguiendo las instrucciones del fabricante, para detectar la presencia de inmunoglobulinas en el citoplasma de las PCs de neonatos. Los anticuerpos primarios y reactivos utilizados fueron los siguientes: anti-cyt IgM-FITC, anti-cyt IgG-FITC, anti- cyt IgA-Biotina, estreptavidina Alexa Fluor 647. Las muestras igualmente fueron adquiridas en el

citómetro de flujo BD LSRFortessa™ Special Order Research Product (BD Biosciences) y los datos analizados en el programa FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star, Inc).

6.4 Evaluación *in situ* de los isotipos de las inmunoglobulinas en las PCs mediante inmunofluorescencia

Para determinar la presencia y localización de las PCs provenientes de los tejidos de neonatos, *in situ*, se colectaron los tejidos en cuestión, se incluyeron en medio para criocortes Tissue-Tek (Sakura Finetek, Cat. 4583) y se congelaron con nitrógeno líquido para su uso posterior. Fue necesario incluir los huesos completos de fémur y tibia (neonatos) previamente embebidos en una solución de gelatina al 2% (J.T. Baker, Cat. 2124) en PBS 1x o bien, la médula ósea (adultos) extraída como se describió anteriormente embebida en gelatina con la finalidad de conservar la estructura del tejido lo más posible. Los criocortes de los tejidos se realizaron en un criostato manual Leica Biosystems CM 1520 (Microsystems Inc., IL, USA) de aproximadamente 5 μm de grosor, los cuales fueron fijados con acetona y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso o utilizados inmediatamente. Una vez fijados los tejidos se utilizó un lápiz hidrofóbico Imm Edge Pen (Vector Laboratories Inc, Cat. H-4000) para delimitar el área. Se rehidrataron los tejidos con solución de lavado de PBS 1x +Tween-20 al 0.01%. Posteriormente, se les colocó una solución de bloqueador universal Power Block, (Universal Blocking Reagent BioGenex, Cat. HK085-5KE) al 1x, diluido en PBS 1x y se incubaron las laminillas por 20 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron las laminillas con solución de lavado y se añadieron los anticuerpos primarios anti-CD138 purificado, anti-IgM-FITC, anti-IgG-FITC, anti-IgA-biotina y control de isotipo anti- IgG rata, (aproximadamente 100 μL de la solución de anticuerpos diluidos en diluyente de anticuerpos), y se incubaron 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ o toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después las laminillas se lavaron nuevamente con solución de lavado, tratando de eliminar lo más posible de residuos, para añadir después el anticuerpo secundario anti-rata-Alexa Fluor 594 y la estreptavidina-Alexa Fluor 488 e incubar de 15 min a 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inmediatamente, se lavaron con la solución de lavado, para luego añadir DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Invitrogen), incubando de 1-5 min. La lista detallada de anticuerpos se encuentra en la tabla 3 de los Anexos. Se volvieron a lavar los tejidos para finalmente, realizar el montaje de las

laminillas con 5 μ L del medio de montaje DABCO (2.5 g/100 mL DABCO [1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano, Sigma-Aldrich, Cat. D2522] 90% glicerol 10% PBS con NaN_3 0.1-0.05%). Las laminillas fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia Olympus DP72 (Olympus Corp., Tokio, Japan) y las imágenes capturadas con el software Image-Pro®Plus 2009 versión 7.0 (Media Cybernetics, Inc. Rockville, MD, USA). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software ImageJ 1.52a (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

6.5 Evaluación de la producción de anticuerpos por ELISPOT

Para evaluar la producción de anticuerpos de las PCs neonatales, se recubrieron las placas de ELISPOT (MultiScreen™, Millipore, Cat. 10402362) con un anticuerpo anti-GAM para detectar a los 3 isotipos de las inmunoglobulinas, en un volumen de 50 μ l/pozo, diluidos en solución amortiguadora de fosfatos (Na_2CO_3 0.015 M NaHCO_3 0.035 M en H_2O destilada) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Después de dos lavados con PBS 1X, se realizó un bloqueo con BSA al 1% en PBS 1X por 1 h a 37 °C. Se obtuvieron suspensiones celulares de Sp, MLN y BM a los días 1 y 14 como se detalló anteriormente y se añadieron 4 x 10⁵ células viables/pozo por duplicado. Las células fueron incubadas por 5 h a 37 °C. Como control fueron utilizadas células de los mismos tejidos provenientes de ratones adultos. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T (Tween-20 al 0.05% en PBS 1X) y se añadieron diluciones óptimas de anticuerpos de detección conjugados a fosfatasa alcalina (anti-IgM-AP, anti-IgG-AP, anti-IgA-AP) incubando durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados con PBS-T y un último con sólo PBS 1X. Posteriormente se visualizó la reacción de fosfatasa alcalina añadiendo el sustrato Sigma Fast BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich, Cat.B5655). Los puntos revelados fueron contados usando el lector automático AID ELISPOT Reader System (Autoimmun Diagnostika GMBH, Straßberg, Germany). Los datos se presentan como Células Secretoras de Abs (ASCs) por 1x10⁶ de células (ASCs/1X10⁶ céls).

6.6 Obtención de muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos y sangre periférica de donadores adultos sanos

Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron colectadas al momento del parto, de infantes de 36-39 semanas de gestación con peso normal, en colaboración con el Dr. Alberto Saucedo del Hospital Regional de Tlalnepantla, Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM), Tlalnepantla de Baz, Estado de México (Anexo 1, Carta de aprobación de protocolo de investigación por Comité de Ética). El consentimiento informado fue firmado por las madres antes del parto. Las células de adulto fueron obtenidas de sangre periférica de donadores adultos sanos mediante punción venosa. Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubos heparinizados para su procesamiento posterior. Los criterios de inclusión y no inclusión se muestran a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Criterios de selección de muestras de sangre de humano.

	Criterios de inclusión	Criterios de no inclusión
Neonatos*	<ul style="list-style-type: none"> • Neonatos sanos nacidos entre 36 y 40 semanas de gestación, con peso normal. • Neonatos provenientes de madres sanas. • Todas aquellas madres que firmen el acuerdo de consentimiento informado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Neonatos prematuros o con alguna patología y/o proceso infeccioso. • Madres que padezcan alguna enfermedad autoinmune, crónico-degenerativa o inmunodeficiencia. • Que las madres hayan atravesado un proceso infeccioso o patológico severo durante el embarazo.
Donadores sanos	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos sanos que deseen participar y firmen el acuerdo de consentimiento informado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Personas que estén atravesando algún cuadro infeccioso, padezcan alguna enfermedad autoinmune, crónico-degenerativa o inmunodeficiencia.

6.7 Aislamiento de células mononucleares de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adultos sanos

Para obtener las células mononucleares de sangre de cordón umbilical de neonatos recién nacidos fue necesario implementar un protocolo modificado para la separación por gradiente de Ficoll, diluyendo la sangre de cordón umbilical en una proporción 1:1 con solución salina, mientras que la sangre periférica de adultos sanos fue diluida 1:1 en PBS 1x estéril. Posteriormente, se llevó a cabo el gradiente de densidad con Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, Cat. 10771) en condiciones de esterilidad, como se explica a continuación. Se colocó Histopaque, 1 parte por 3 partes de sangre en un tubo Falcon de 50 mL, se centrifugó a 1600 rpm por 30 min a temperatura ambiente; se obtuvo el anillo de mononucleares y se lavaron con PBS 1x estéril, centrifugando 5 min a 1200 rpm (2x).

Finalmente, las células se suspendieron en 3-5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, ThermoFisher Scientific, Cat. 10432512) para su uso posterior. La viabilidad y conteo celular fueron evaluados por el método de exclusión con azul de tripano en una cámara de Neubauer.

6.8 Fenotipificación de las PCs de neonatos humanos por citometría de flujo

Para la identificación y caracterización de las PCs en sangre de cordón umbilical de neonatos recién nacidos se realizaron tinciones de citometría de las células mononucleares, utilizando células de donadores adultos sanos como control. Los anticuerpos, anti-CD138-BV421, anti-CD38-PE-Cy7 y anti-Blimp-1-AF488 fueron utilizados para identificar a las células plasmáticas, mientras que anti-CD45-Pacific Orange, anti-CD19-APC-H7, anti-CD27-PerCP-Cy5.5, anti-Bcl-2-AF647, anti-HLA-DR-PE-Cy7, anti-CXCR4-PE-Cy5, anti-XBP1-PE, anti-Ki-67-PE, anti-cyt Kappa LC-APC y anti-cyt Lambda LC-PE fueron utilizados para caracterizar la población. Se colocaron de $1-2 \times 10^6$ millones de células por tubo y se siguió el protocolo de tinción descrito anteriormente. Para determinar las fases del ciclo celular en las que se encuentran las PCs en circulación, se siguió la metodología descrita en Vignon, Debeissat [51] utilizando una combinación de anti-Ki67-PE con el colorante para ácidos nucleicos 7-AAD. Se adquirieron al menos 400,000 eventos por muestra en el citómetro de flujo BD LSRFortessa™ Special Order Research Product (BD Biosciences). El análisis de los datos se ejecutó con el programa FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star, Inc). Las listas detalladas de los anticuerpos empleados para esta metodología se encuentran en la tabla 2 del Anexo.

7. RESULTADOS

Como se describió anteriormente, para evaluar la presencia de células plasmáticas (PCs) en suspensiones celulares provenientes de tejidos linfoides de ratón, fue necesario realizar un pool de diferentes individuos en las diferentes edades a considerar; por lo tanto, la “n” fue de al menos 3 individuos en el grupo de los adultos y de entre 3-12 individuos por edad del grupo de los neonatos, en 3-4 experimentos independientes. Siguiendo esta estrategia experimental, identificamos células plasmáticas (CD138+ CD98+) desde el día 1 en los tres

órganos analizados, aunque en proporciones muy bajas, como era de esperarse. En la figura 5A se muestran los gráficos representativos del análisis por citometría de flujo. Podemos observar que hay una tendencia a que la proporción de PCs incremente gradualmente conforme a la edad. En el bazo, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el día 1 y los adultos; y es mayor la proporción de PCs en MLN al día 7, comparando con los días 1 y 4 (ANOVA de una vía, prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni, $*P<0.05$). Mientras que la proporción de PCs parece mantenerse constante en el MLN (Figura 5B).

Al verificar estos datos, pero analizando el número absoluto de PCs por órgano (Figura 5C), encontramos que este incremento es gradual en el bazo, mientras que en la médula ósea el número de PCs de los adultos, se alcanza desde los 7 días de edad. En el caso del MLN el incremento parece ser más sutil, y las diferencias significativas en el número de PCs se encontraron solamente entre el día 1 y los adultos (ANOVA de una vía, prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$). Con estos resultados bajo este acercamiento de identificación de células plasmáticas descrito en Tellier & Nutt [50], podemos decir que por lo menos desde las 24 horas posteriores al nacimiento, los neonatos de ratón presentan células plasmáticas en los tejidos linfoides analizados.

Blimp-1 es un factor de transcripción muy importante para dirigir la diferenciación de linfocitos B hacia PCs, es por ello que a continuación buscamos la expresión de esta proteína en el interior de las PCs CD138+CD98+, mediante citometría de flujo. En la figura 6A se presentan los histogramas que representan la expresión y proporción de este factor de transcripción en las PCs provenientes de los diferentes tejidos evaluados, donde puede observarse que Blimp-1 está presente del 70 al 95% de las PCs analizadas. Al realizar el análisis estadístico (Figura 6B), no hay diferencias en cuanto a la expresión de Blimp-1 en bazo o MLN, sin embargo, en BM encontramos que la proporción de células positivas para Blimp-1 es mayor los días 4 y 7, que en el adulto (ANOVA de una vía, prueba posterior de comparaciones múltiples de Bonferroni, $**P<0.01$). De acuerdo con la alta expresión que

encontramos de Blimp-1 en las células CD138+CD98+ podemos decir que, efectivamente las células analizadas forman parte de la población de PCs en ratones neonatos.

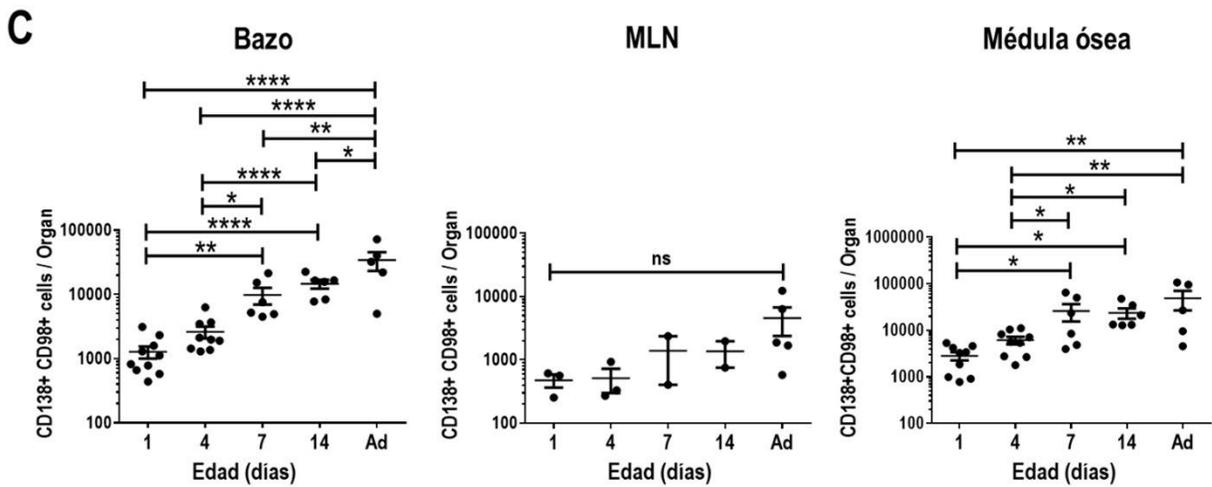
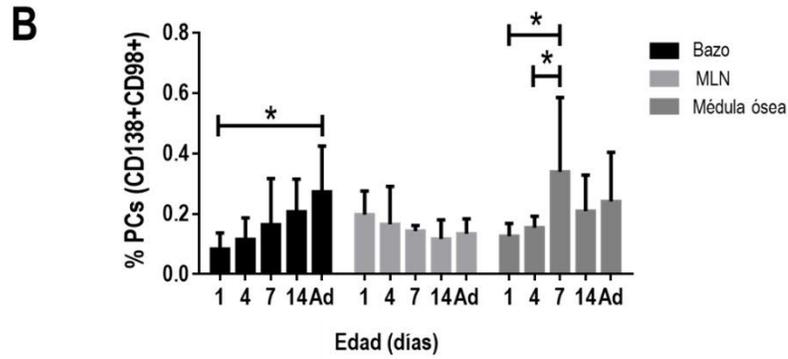
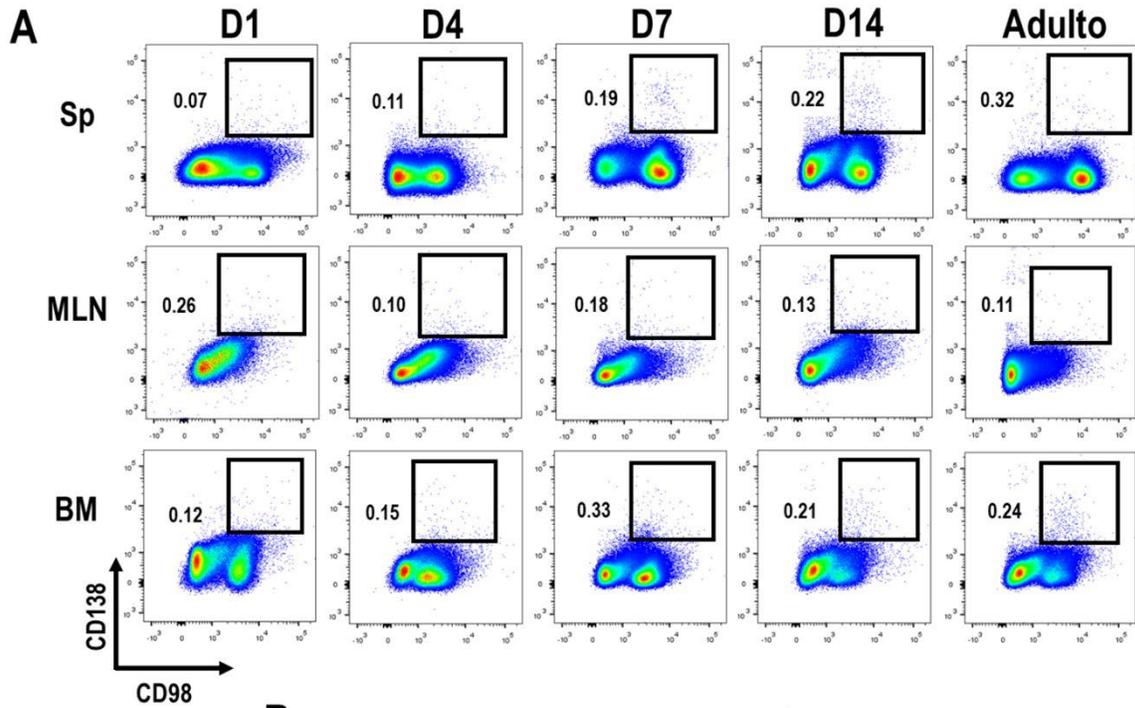


FIGURA 5 | Células Plasmáticas (PCs) CD138+CD98+ aparecen desde tiempos tempranos del desarrollo del ratón. Dot plots representativos de las Células Plasmáticas (PCs; CD138+CD98+) a diferentes edades (día 1, D1; día 4, D4; día 7, D7; día 14, D14 y Adultos, Ad) y tejidos (bazo, Sp; ganglio linfático mesentérico, MLN; médula ósea, BM) de ratón (A), mostrando el porcentaje correspondiente a su región. La proporción de PCs en adultos fue significativamente mayor que al día 1 en el Sp; también fue mayor al día 7 comparados con el día 1 y 4 en BM (B). El número absoluto de PCs incrementa gradualmente en los tejidos analizados, aunque no fue significativo en MLN, se puede observar una tendencia (C). Las células fueron seleccionadas previamente en la región de linfocitos (FSC-A vs SSC-A/ Eventos únicos (datos no mostrados)). Los datos que se muestran son el *pool* de 3 experimentos independientes, representan la media \pm SEM y fueron analizados con una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.00001$

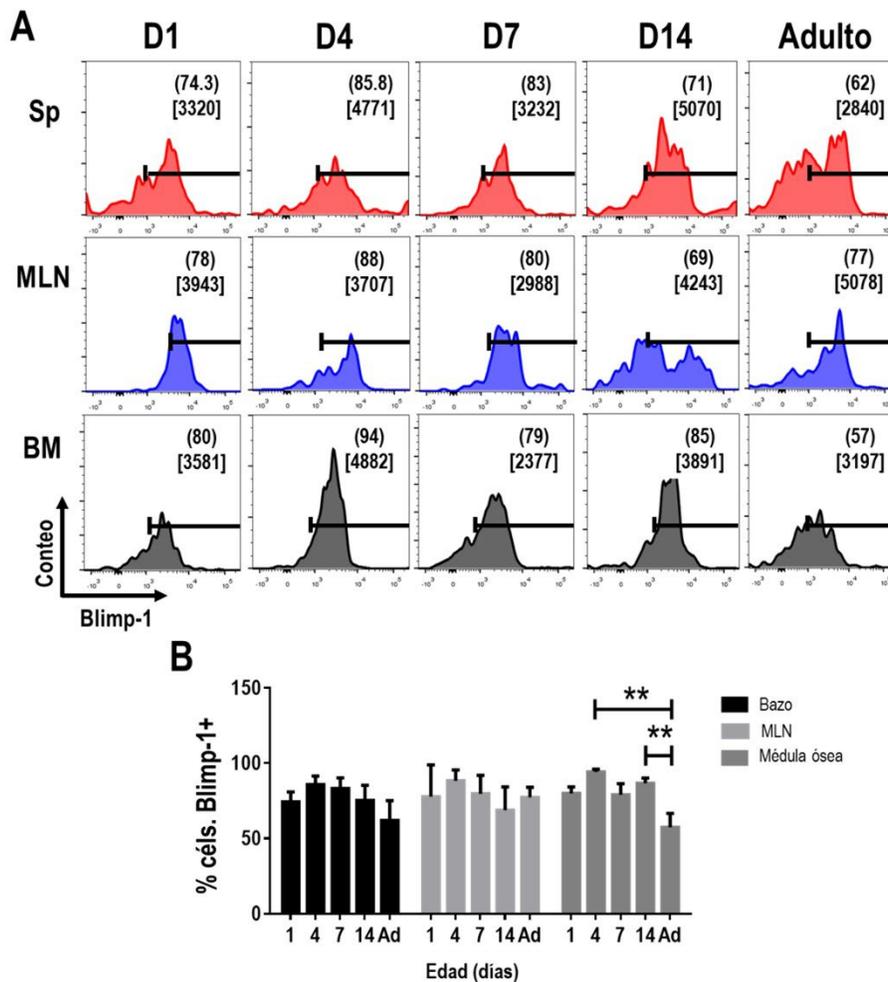


FIGURA 6 | Expresión del factor de transcripción Blimp-1 en PCs en etapas tempranas del desarrollo del ratón. Histogramas representativos de la expresión de Blimp-1 a diferentes edades y tejidos de ratones neonatos (A), mostrando el porcentaje de células positivas en paréntesis y la intensidad media de fluorescencia (MFI) en corchetes. La proporción de Blimp-1 fue significativamente menor en las PCs de adultos comparados con las PCs del día 4 y día 14 en BM (B). Las células fueron seleccionadas previamente en la región de linfocitos (FSC-A vs SSC-A/ Eventos únicos (datos no mostrados)). Los datos que se muestran son el *pool* de 3 experimentos independientes, representan la media \pm SEM y fueron analizados con una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni ** $P < 0.01$.

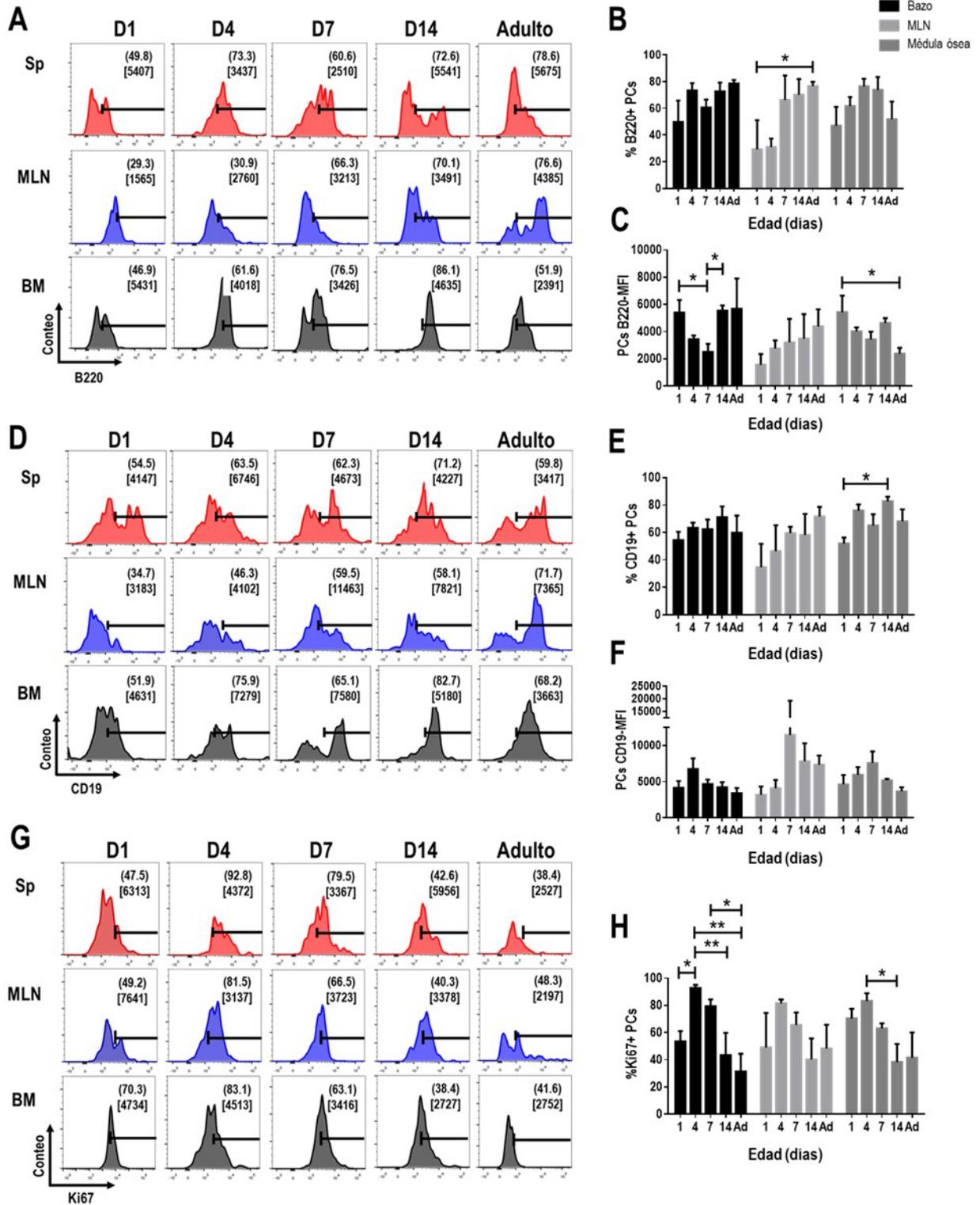


FIGURA 7 | PCs neonatales presentan marcadores de LcB (B220 y CD19) y de proliferación (Ki67) en los tejidos linfoides analizados. Histogramas representativos de la expresión de B220 a diferentes edades y tejidos en ratón (A), los porcentajes se encuentran en paréntesis y MFI en corchetes. Los análisis estadísticos mostraron que adultos presentan una mayor proporción de PCs B220+ en comparación con los ratones del día 1 en MLN (B). Por su parte, fueron encontradas diferencias estadísticas en la MFI de B220 en PCs provenientes de Sp y BM (C). Histogramas representativos de la expresión de CD19 a diferentes edades y tejidos del ratón (D). La proporción de PCs CD19-positivas al día 14 fue significativamente mayor que al día 1 (E) aunque no se encontraron diferencias en la MFI de los grupos analizados (F). El estado proliferativo de las PCs fue analizado mediante la tinción del marcador de proliferación Ki67 (G). Las células fueron seleccionadas previamente en la región de linfocitos (FSC-A vs SSC-A/ Eventos únicos (datos no mostrados). Los datos que se muestran son el *pool* de 3 experimentos independientes, representan la media \pm SEM y fueron analizados con una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Una de las características de las PCs es la pérdida o disminución de la expresión de moléculas o marcadores propios de los linfocitos B, por ejemplo, la isoforma de CD45, B220, también usado como pan-marcador de células B en el ratón y el co-receptor del BCR (receptor de células B), CD19. Al caracterizar la población de PCs en neonatos mediante la presencia y expresión de estos marcadores, por citometría de flujo; encontramos que la proporción de PCs B220 positivas estaba en un rango de 50-80% en Sp, siendo mayor en los adultos. Mientras que, en MLN, la proporción de PCs positivas para B220 a los días 1 y 4 es menor que a los días 7, 14 y en los adultos. Esta diferencia es significativa entre el grupo del día 1 y el grupo de los adultos (* $P < 0.05$). En BM, encontramos una proporción de células B220 positivas de 50 al 70%, con una tendencia a que dicha proporción sea mayor en los días 7 y 14 (Figura 7B). Al evaluar la intensidad media de fluorescencia (MFI) de este marcador (Figura 7C), encontramos que su expresión es significativamente menor (* $P < 0.05$) en las PCs al día 7 (media=2510.5) comparado con los días 1 (media=5407.1) y 14 (media=5541.3) en bazo. La MFI de B220 en MLN tiende a incrementar conforme a la edad, aunque no hay diferencias estadísticas entre los grupos de edad analizados; mientras que, por el contrario, la expresión de B220 en PCs de BM parece ir en decremento conforme a la edad. La media de expresión más alta se encontró al día 1 (media=5430.8) y la menor en el grupo de los adultos (media=2390.8; * $P < 0.05$). Al evaluar el co-receptor del BCR, CD19, encontramos que entre el 35 y el 70% de las PCs de bazo y MLN presentan esta molécula en su membrana celular, e incluso en BM su proporción llega a ser del 82.7% al día 14. Este

último valor, es estadísticamente mayor ($*P<0.05$) al que presentan las PCs de neonatos de 1 día de nacidos (Figura 7E). En general, la intensidad media de fluorescencia de CD19 también es mayor en todos los órganos evaluados, comparada con el antígeno B220, la MFI mínima fue de alrededor de 3000 y la mayor de aproximadamente 11,500 (MLN, d7). Aunque no se encontraron diferencias significativas, pareciera que la expresión de CD19 es menor en Sp y BM que en MLN, a excepción de lo encontrado al día 7, donde parece que aumenta para después volver a disminuir y llegar a los niveles de expresión de las PCs de ratones adultos (Figura 7F). Con estos resultados podemos decir que las células PCs neonatales aún conservan en su membrana niveles variables de expresión de marcadores propios de células B, lo que nos indica que estas células continúan con su proceso de diferenciación hacia PCs quiescentes y/o en estado de reposo. Es por ello que buscamos la proporción de PCs en fase activa del ciclo celular, a través de la expresión del marcador de proliferación Ki67. Los resultados mostraron expresión de Ki67 alta en las PCs provenientes de los distintos órganos analizados (Figura 7G). El patrón que mostró es peculiar, presenta una proporción más baja al día 1 (~50%) que incrementa notablemente al día 4 (~82-93%), comienza a disminuir a partir del día 7 y alcanza una proporción similar a la presentada en los adultos, desde el día 14 (~30-40%). En las PCs provenientes de Sp y BM fueron observadas diferencias significativas ($*P<0.05$ y $**P<0.01$). Dados los resultados descritos anteriormente, podemos decir que la población de PCs analizada, incluye una mezcla de células en diferentes estadios de diferenciación, muy probablemente PBs, que conservan algunas características propias de linfocitos B, pero también presentan marcadores propios de PCs.

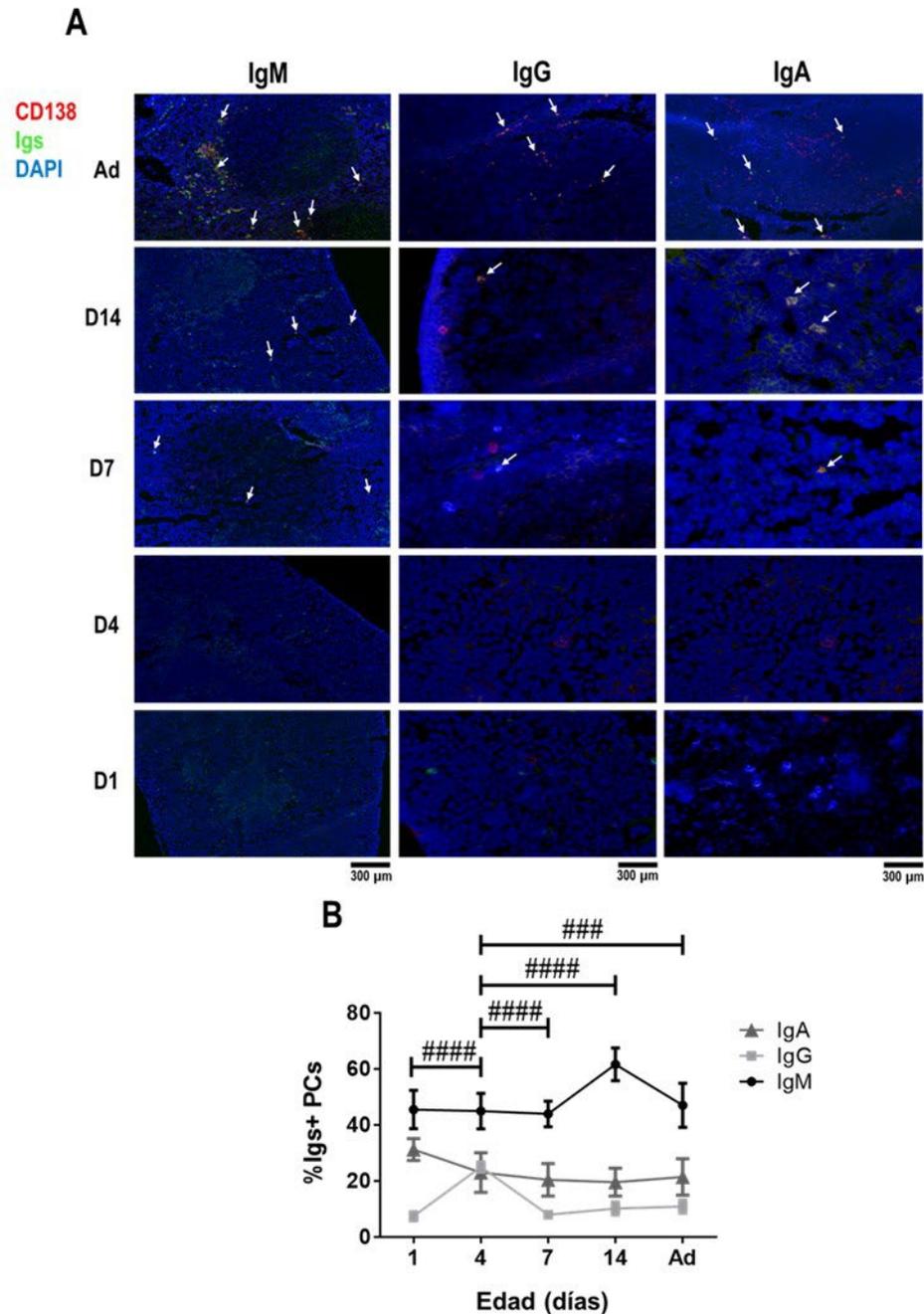


FIGURA 8 | Distribución de PCs *in situ* y análisis de citometría de flujo de las PCs inmunoglobulinas-positivas en bazo. Inmunofluorescencia de Sp de ratones neonatos a diferentes edades teñidos con anticuerpos específicos para CD138 (rojo) y cada uno de los isotipos de las Igs (IgM, IgG, IgA, verde); núcleos contrateñidos con DAPI (azul) (A). Los cortes de tejidos de adultos y los de IgM de neonatos mostrados fueron capturados a una magnificación de 10x (barra de escala, 300 μ m), mientras que las imágenes de IgG e IgA fueron capturadas a 40x (barra de escala, 25 μ m). Las flechas indican las células dobles positivas. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Análisis de Igs intracelulares de PCs (B), mostraron una proporción mayor de PCs IgG-positivas comparadas con los otros grupos. Las proporciones de IgM e IgA no presentaron diferencias. Los datos que se muestran son el *pool* de 3 experimentos independientes, representan la media \pm SEM y fueron analizados con una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni *** $P < 0.001$, **** $P < 0.00001$. Los símbolos en la gráfica se usaron para diferenciar los isotipos de las Igs IgM (*), IgG (#) e IgA (\neq).

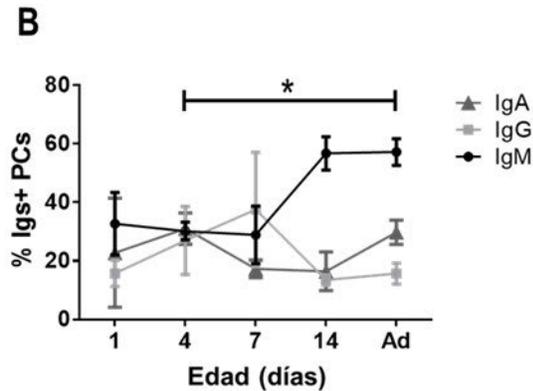
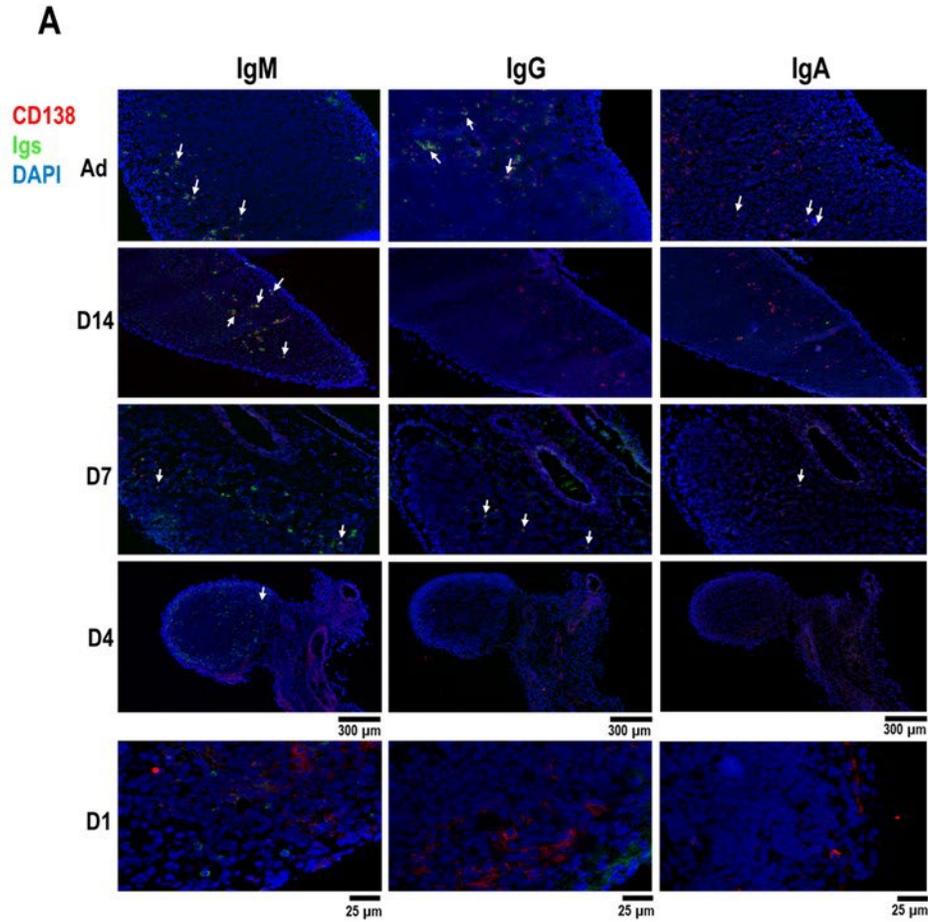


FIGURA 9 | Distribución de PCs *in situ* y análisis de citometría de flujo de las PCs inmunoglobulinas-positivas en MLN. Inmunofluorescencia de MLN de ratones neonatos a diferentes edades teñidos con anticuerpos específicos para CD138 (rojo) y los isotipos de las Igs (verde); núcleos contrateñidos con DAPI (azul) (A). Los cortes de tejidos mostrados fueron capturados a magnificación de 10x (barra de escala, 300 μm), excepto aquellos de D1 capturados a 40x (barra de escala, 25 μm). Las flechas indican a las células dobles positivas. Los análisis de Igs intracelulares de PCs (B), mostraron una proporción mayor de PCs IgM-positivas en adultos comparadas con las PCs al D4. La proporción fue similar para IgG e IgA. Los datos que se muestran corresponden a un *pool* de 3 experimentos independientes, representan la media ± SEM y fueron analizados con una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni *P < 0.05.

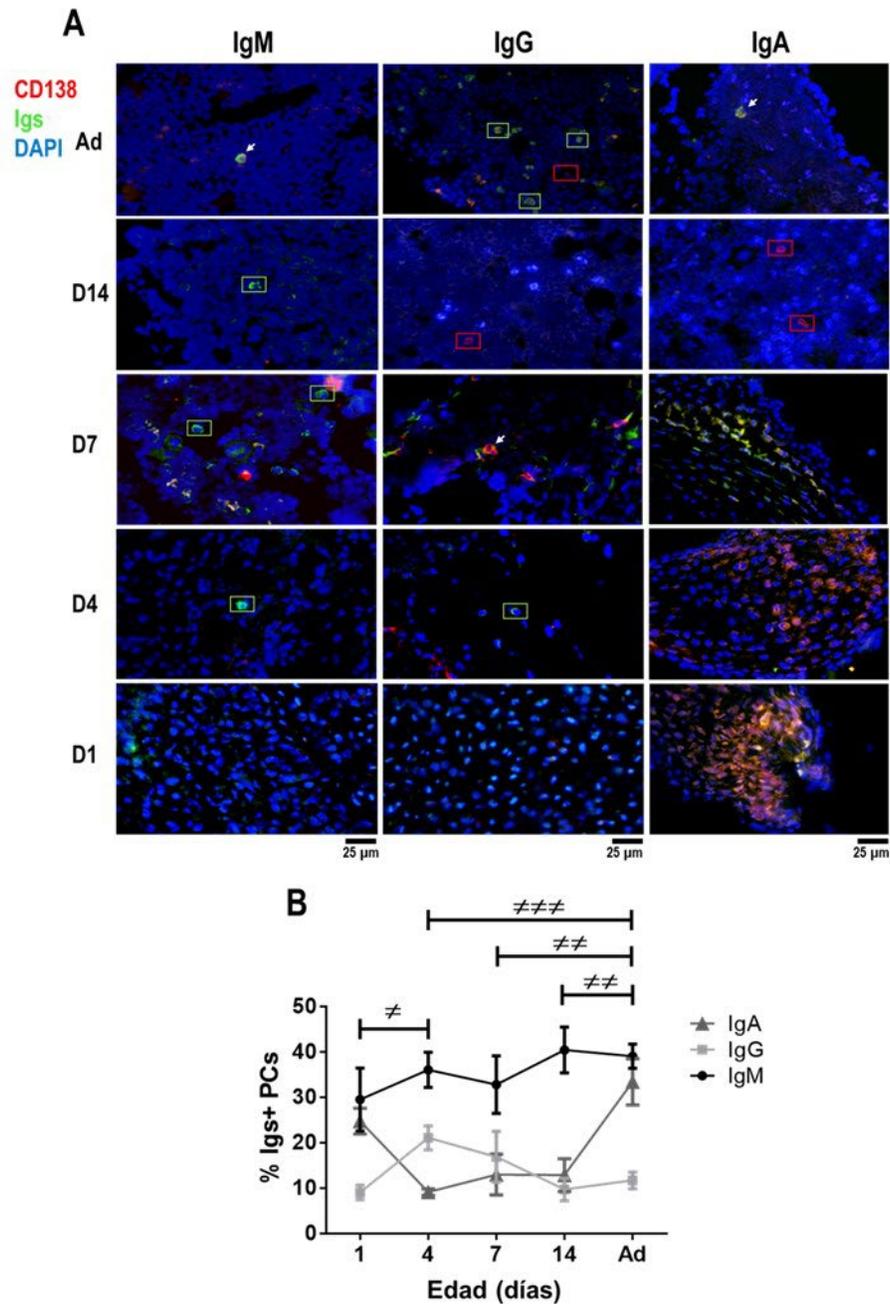


FIGURA 10 | Distribución de PCs *in situ* y análisis de citometría de flujo de las PCs inmunoglobulinas-positivas en BM. Inmunofluorescencia de BM de ratones neonatos a diferentes edades teñidos con anticuerpos específicos para CD138 (rojo) y los isotipos de las Igs (verde); núcleos contrateñidos con DAPI (azul) (A). Los cortes de tejidos fueron capturados a 40x (barra de escala, 25 μ m). La flecha indica una célula CD138+IgM+, los cuadros rojos indican células CD138 simples positivas y los verdes, Igs positivas. Los análisis de Igs intracelulares (B) mostraron una proporción significativamente mayor en adultos que en los días 4, 7 y 14, igualmente hubo una mayor proporción de PCs IgA-positivas al D1 que en el D4. Los datos que se muestran corresponden a un *pool* de 3 experimentos independientes, representan la media \pm SEM y fueron analizados con una ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni *P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Los símbolos fueron usados para distinguir los isotipos IgM (*), IgG (#) e IgA (≠).

Por otro lado, quisimos corroborar la presencia de estas PCs *in situ*, haciendo criocortes de los tejidos en cuestión para teñirlos y observarlos por microscopía de fluorescencia. Se realizó un marcaje doble de las células utilizando un anticuerpo anti-CD138 (marcador de PCs) combinado con un anticuerpo para detectar cada uno de los isotipos de las inmunoglobulinas anti-IgM, anti-IgG e anti-IgA, además de DAPI para teñir los núcleos celulares. Los resultados mostrados son imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes y los controles de isotipo de las tinciones se muestran en la Figura S1. La primera línea corresponde a los tejidos de adultos que fueron usados como control. Fue posible observar células positivas para CD138 y cada una de las inmunoglobulinas (flechas blancas) a partir del día 7 en bazo; las cuales se encuentran distribuidas principalmente en las zonas interfoliculares y en los cordones medulares del mismo. En las edades de 1 y 4 días no es posible apreciar células dobles positivas en los campos capturados, aunque claramente desde el día 1 se aprecian agregados de LcB IgM positivos y algunas células CD138 positivas, principalmente al día 4. En la figura 8B se muestran los resultados del análisis de las PCs con las inmunoglobulinas citoplásmicas, obtenidos a través de tinciones intracelulares de citometría de flujo. Los resultados muestran una proporción significativamente mayor de PCs IgG-positivas al día 4, comparada con el resto de las edades evaluadas; mientras que la proporción de IgM e IgA es similar en todos los grupos de edad. Aunque cabe señalar alrededor del 50% de las PCs están contienen IgM en su citoplasma, y éste fue el isotipo predominante.

En la figura 9A se señalan con flechas las células dobles positivas para el marcador CD138 y cada una de las inmunoglobulinas en el ganglio linfático mesentérico. Al día 14 es difícil apreciar células dobles positivas para CD138-IgG y CD138-IgA con el aumento de 10x, sin embargo, pueden observarse varias de isotipo IgM. A las edades más tempranas de 1 y 4 días, podemos observar células simple positivas para los marcadores de interés, pero no dobles. Al evaluar los isotipos de las Igs en las PCs por citometría de flujo (Figura 9B), encontramos que la proporción de PCs para las 3 clases de anticuerpos es muy similar en las diferentes edades analizadas, excepto por una diferencia significativa entre la

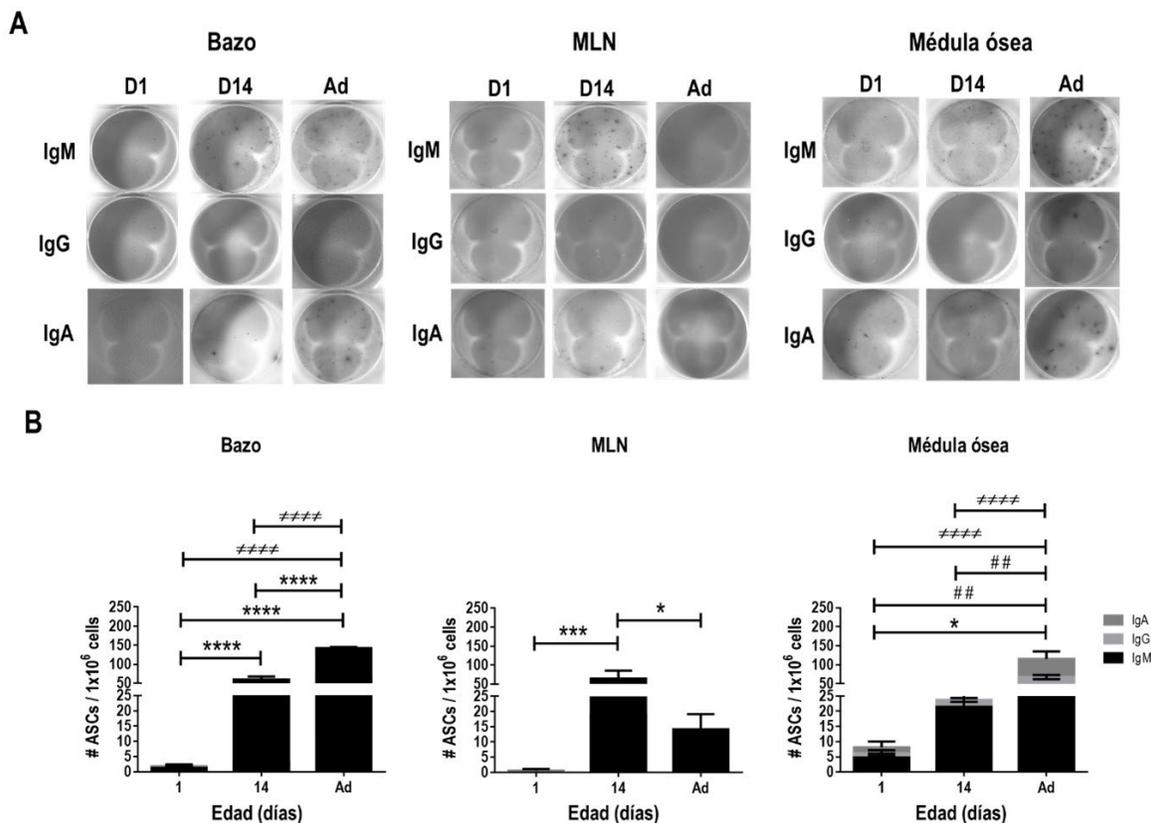


FIGURA 11 | Presencia de Células Secretoras de Anticuerpos (ASCs) en tejidos linfoides de neonatos a partir del día 1 de vida. Imágenes representativas de células secretoras de anticuerpos analizadas a los días 1, 14 y en adultos, mediante ELISPOT. Cada punto representa una ASC (A). Estimado de ASCs/1x10⁶ de células por órgano. Los resultados mostraron una mayor cantidad de células IgM- e IgA- secretoras en los adultos comparados con los neonatos en Sp; sin embargo, hubo una cantidad mayor de células secretoras de IgM al día 14 comparado con el día 1 y con los adultos en MLN y células secretoras de IgM e IgA pudieron observarse desde el día 1 en BM, aunque en menor cantidad que en los neonatos de D14 y en adultos (B). Los datos mostrados corresponden a 1 experimento con una n de 3 ratones por grupo (n=3). Se graficó la media ± SEM y fueron analizados con una ANOVA de dos vías con una prueba posterior de Bonferroni *P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Los símbolos fueron usados para distinguir los isotipos IgM (*), IgG (#) e IgA (≠).

proporción de PCs IgM-positivas en los neonatos de 4 día de edad y los adultos, siendo mayor en estos últimos (*P<0.05).

El tejido proveniente de médula ósea presenta un alto nivel de autofluorescencia, lo que complica su manipulación. Sin embargo, fue posible detectar algunas células simples positivas (marcadas con recuadros en la imagen), cuya morfología sugiere que podrían tratarse de PCs e incluso claramente puede apreciarse una célula CD138+IgM+ en el control de adulto (flecha, Figura 10A). La evaluación por citometría de flujo (Figura 10B), mostró

que hay una proporción muy similar de PCs IgM e IgG positivas en todas las edades analizadas; no obstante, la proporción de PCs IgA-positivas es muy similar al día 1 y en el adulto. En los días 4, 7 y 14 se encontró una proporción estadísticamente menor de estas células, con respecto al grupo de adultos y menor al día 4 con respecto al día 1 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

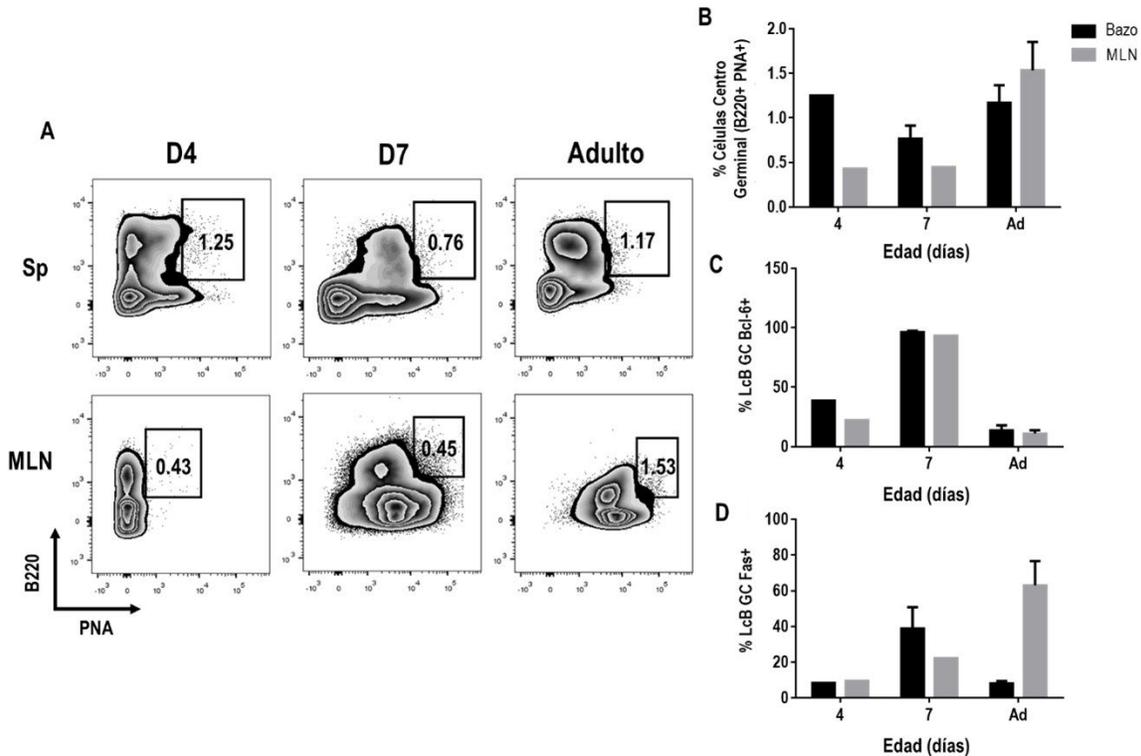


FIGURA 12 | Identificación de células de Centro Germinal (GC, B220+ PNA+) en neonatos de 4 y 7 días de edad. Zebra plots representativos de células CG analizadas a los días 4, 7 y en adultos, mediante citometría de flujo en bazo y MLN (A). Proporción de linfocitos B de CG en neonatos (B). Proporción de linfocitos de CG Bcl-6 positivos (C) y Fas-positivos (D). Para analizar su fenotipo las células fueron previamente seleccionadas a partir de la región de Linfocitos/Singletes (datos no mostrados). Los datos corresponden a 1 experimento independiente con una n=3 por cada grupo de edad y representan la media \pm SEM.

La siguiente pregunta que quisimos abordar, fue saber si estas células cuyo fenotipo corresponde con PBs o PCs en proceso de diferenciación y que además contienen las 3 clases de inmunoglobulinas en su citoplasma, son entonces también capaces de secretar dichas inmunoglobulinas. Para ello, realizamos un ensayo de ELISPOT para identificar a las células secretoras de anticuerpos (ASCs) en los órganos evaluados, eligiendo dos edades

representativas de los neonatos, al día 1 y al día 14, utilizando las células de adulto como control. En la figura 11A podemos observar las imágenes obtenidas de los pozos, donde cada punto que se observa corresponde a una célula secretora del isotipo que se indica. Interesantemente, encontramos células secretoras de los 3 isotipos tanto en Sp como en BM desde el día 1 de edad, no así en el MLN. Al analizar los datos obtenidos (Figura 11B), de manera general, observamos que las células que predominan en Sp son las productoras de IgM, seguidas por las secretoras de IgA y al último las de IgG en muy bajas cantidades, en los 3 grupos de edad. En MLN fue muy difícil detectar ASCs en los ratones de 1 día de vida, sin embargo, encontramos una cantidad mayor de células secretoras de IgM al día 14 comparado con el día 1 y los adultos, y una tendencia a presentar mayor número de secretoras de IgA también al día 14. Con respecto a BM, encontramos un número de células secretoras de IgA mayor tanto al día 1 (media=8.1) como en adultos (media=115.2), seguido de las productoras de IgM y pocas células que secretan IgG; mientras que al día 14 encontramos un número mayor de células secretoras de IgM comparado con las otras inmunoglobulinas, aunque las diferencias estadísticas que encontramos están en relación al control de células de adulto, debido a que su número va en incremento conforme a la edad, como hemos observado en resultados previos. De estos resultados, nos llaman la atención a que, efectivamente pueden encontrarse PCs que secretan anticuerpos en neonatos a tan sólo 24 horas después de nacidos, principalmente en médula ósea y que la mayoría de dichas células secretan inmunoglobulinas de tipo IgA, lo cual concuerda con los hallazgos obtenidos al analizar las inmunoglobulinas intracelulares por citometría de flujo.

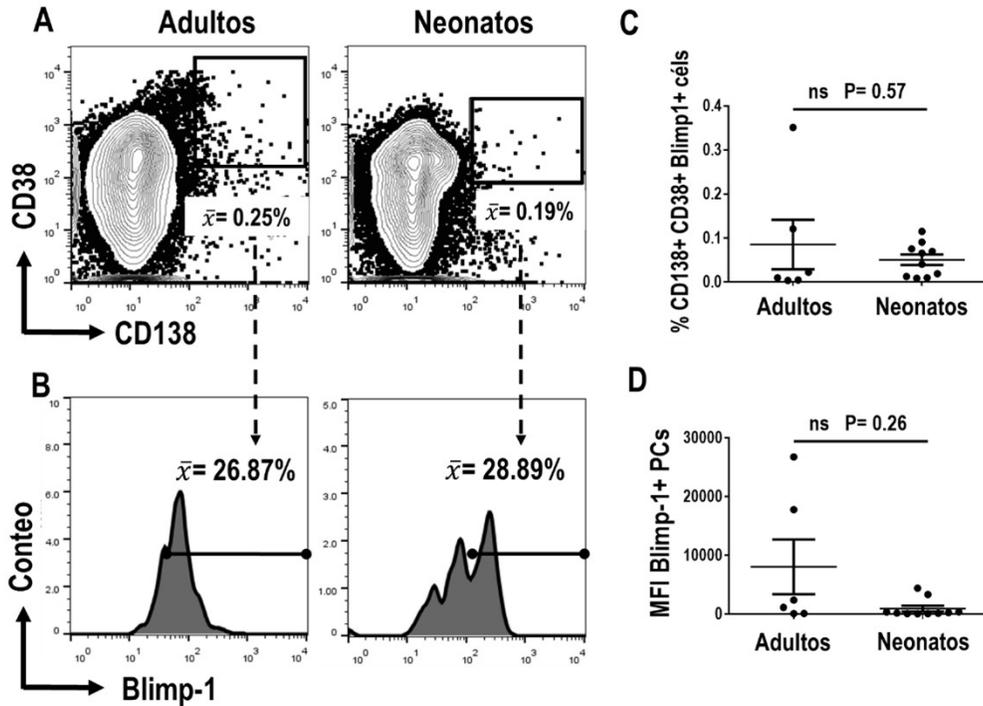


FIGURA 13 | La frecuencia de las PCs (CD138+ CD38+ Blimp-1+) en neonatos humanos es similar a la de los adultos. Dot plots representativos (A) e histogramas (B) de citometría de flujo de la selección de PCs en sangre periférica (Adultos) y en cordón umbilical (Neonatos). Las células Blimp-1+ fueron seleccionadas de la población CD138+ CD38+, considerando como PCs únicamente a las células triple positivas para estos marcadores. Selección previa de células a partir de la región de linfocitos (FSC-A vs SSC-A) / Singletes (figura B, Anexos). El análisis de PCs no mostró diferencias en la proporción de esta población (C) y tampoco la expresión de Blimp-1 fue estadísticamente significativa entre grupos (D). Los datos mostrados corresponden a un *pool* de 3-5 experimentos independientes, representan la media \pm SEM, y fueron analizados con una corrección de Welch no paramétrica (C) o una prueba de *t* de Mann-Whitney (D).

Como se expuso anteriormente, una de las fuentes de generación de células plasmáticas es la activación de linfocitos B convencionales y la subsecuente formación de centros germinales, los cuales tienen como resultado la formación de linfocitos B de memoria y/o PCs. Es por esta razón que buscamos la presencia de linfocitos B de centro germinal (CG) a los 4 y 7 días de edad, los cuales fueron identificados conforme a lo reportado en Shinall y colaboradores [52], utilizando la combinación de B220 y PNA (*peanut agglutinin*, aglutinina de cacahuete) que marca a las células de CG en tejidos linfoides. En la figura 12 podemos observar células con fenotipo B220+ PNA+ Bcl-6+ Fas+ en bazo y MLN de ratones neonatos a los 4 y 7 días, así como en adultos. Aunque la proporción de estas células es baja, es conveniente recordar que los experimentos fueron realizados sin contar con un estímulo antigénico extra, lo cual explica la cantidad de células identificadas. Los resultados muestran

una proporción mayor de células de CG (B220+ PNA+) con la expresión de Bcl-6 a los 7 días en los órganos analizados, lo que concuerda con la cinética de activación de células a través de una reacción folicular; y una mayor proporción de células GC Fas-positivas en el MLN de adultos. Cabe destacar que estos son resultados preliminares de un experimento independiente con una n=3, por lo que se requieren más repeticiones para corroborar estas observaciones. Sin embargo, esta aproximación inicial nos remite a la posibilidad de que, al menos cierta proporción de las PCs neonatales que identificamos, puedan ser resultantes de reacciones de centro germinal.

Dado que identificamos PCs en neonatos de ratón y por la relevancia de la contribución de estas células a la inmunidad humoral en individuos recién nacidos, analizamos esta población celular en muestras de sangre de cordón umbilical. Para humanos consideramos a aquellas células triples positivas para los marcadores CD138+ CD38+ Blimp-1+ como PCs (figura 13A y B). Encontramos esta población tanto en sangre periférica de adultos no inmunizados como en sangre de cordón umbilical de neonatos sanos al nacer. Sus proporciones son muy similares entre ambos grupos de edad (figura 13C), ya que no encontramos diferencias significativas al realizar el análisis estadístico. Además, analizamos la intensidad de expresión del factor de transcripción Blimp-1, y tampoco encontramos diferencias entre neonatos y adultos (figura 13D). Por lo tanto, podemos concluir que la población celular de células plasmáticas CD138+CD38+Blimp-1+ está presente en sangre de cordón umbilical. Para comprobar la presencia de células CD138 positivas en las muestras humanas, realizamos tinciones por inmunocitoquímica de muestras de sangre procesadas en Cytospin, en las cuales encontramos señal positiva únicamente en las muestras de

cordón umbilical, cuya morfología corresponde a la esperada en células plasmáticas (son células con núcleos excéntricos y abundante citoplasma) (Figura 2S).

La evaluación de las cadenas ligeras de las Igs es importante para la caracterización de mielomas en pacientes oncológicos, por lo que quisimos evaluar si existía alguna preferencia por el uso de las cadenas ligeras en PCs neonatales (figura 14A). Interesantemente, encontramos que las PCs de neonatos preferentemente expresan la cadena ligera lambda comparada con los adultos (** P<0.01) que presentan una mayor proporción de PCs con la cadena ligera kappa (*P<0.05) (figura 14B).

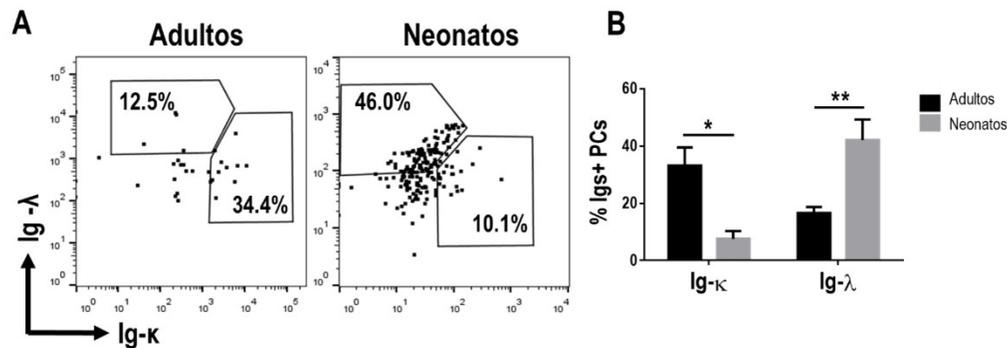


FIGURA 14 | PCs de sangre de cordón umbilical expresan preferentemente la cadena ligera lambda (λ) y los adultos presentan una mayor proporción de la cadena ligera kappa (κ) en las inmunoglobulinas. Dot plots representativos de citometría de flujo de PCs de adultos y neonatos (A) mostrando la proporción de células positivas para las cadenas ligeras de las Igs. Fue realizada una selección previa de células a partir de la población de PCs (CD138+CD38+Blimp-1+) /Linfocitos (FSC-A vs SSC-A) / Singletes (figura B, Anexos). Los análisis estadísticos mostraron que los adultos expresan preferentemente la cadena ligera κ , mientras que los neonatos expresan la cadena λ (B). Los datos mostrados corresponden a un *pool* de 3-5 experimentos independientes, representan la media \pm SEM, y fueron analizados con una prueba de *t* con corrección de Welch no paramétrica * P<0.05, **P<0.01.

Una vez identificada esta población de PCs, decidimos evaluar la expresión de diferentes moléculas y factores de transcripción importantes para la identidad y diferenciación de estas células. Como se mencionó anteriormente, XBP-1 es un factor de transcripción importante para controlar la actividad efectora de estas células, debido a su relación con el control de la respuesta al estrés generado por proteínas no plegadas; al evaluar su presencia y expresión en PCs neonatales humanas, encontramos que alrededor de un 73% (figura 15A) de estas células presentan este factor de transcripción. Esta proporción es muy similar a la encontrada en PCs de adultos (figuras 15B y C). Para ampliar la caracterización de nuestra población de PCs decidimos evaluar la expresión de diferentes moléculas asociadas a linfocitos B, tales como CD45 y CD19, a memoria como CD27, moléculas de *homing* como CXCR4 y un marcador de supervivencia de PCs como Bcl-2 (figura 16, tabla 2). Nuestros

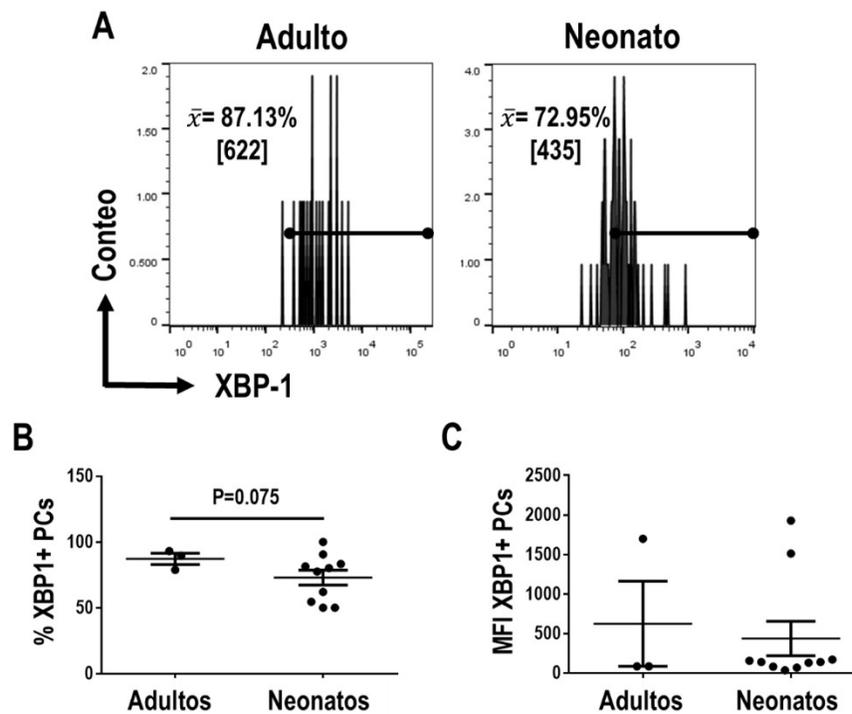


FIGURA 15 | XBP-1 se expresa en PCs neonatales en proporción similar a los adultos. Histogramas representativos de citometría (A) PCs de adultos y neonatos mostrando el porcentaje de células positivas y la MFI (corchetes) de XBP-1. Se realizó una selección previa de células a partir de PCs (CD138+CD38+Blimp-1+) /Linfocitos (FSC-A vs SSC-A) / Singletes (figura B, Anexos). Los neonatos expresan XBP-1 en proporción similar a los adultos ($P=0.075$) (B). No hubo diferencias significativas cuando se evaluó la MFI de XBP-1 en PCs (C). Los datos mostrados corresponden a un *pool* de 3-5 experimentos independientes, representan la media \pm SEM, y fueron analizados con una prueba de *t* con corrección de Welch no paramétrica.

resultados demostraron que las PCs de cordón umbilical presentan un fenotipo similar al exhibido por PCs de individuos adultos sanos, excepto por la menor proporción de PCs positivas para el correceptor CD19 en neonatos (*P<0.05).

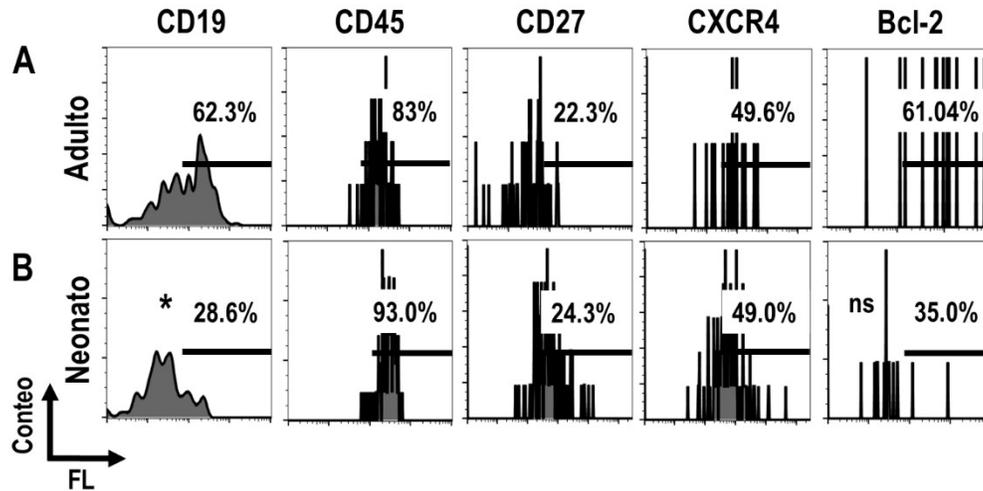


FIGURA 16 | Las PCs de neonatos presentan un fenotipo similar al de los adultos. Histogramas representativos de PCs de adulto (A) y neonatos (B) mostrando las células positivas para varios marcadores relevantes para PCs (indicados en la figura). Se realizó una selección previa de células a partir de PCs (CD138+CD38+Blimp-1+) /Linfocitos (FSC-A vs SSC-A) / Singletes (figura B, Anexos). Las PCs de neonatos expresan CD19 en menor proporción comparada con los adultos (* P≤0.05), mientras que no hay diferencias significativas en los demás marcadores analizados. Los datos son representativos de 3-5 experimentos

	Porcentaje		
	Adultos	Neonatos	Valor P
CD19	62.3 ± 24.65	28.64 ± 24.32	0.033*
CD45	83.0 ± 33.07	93.08 ± 15.63	0.256
CD27	22.36 ± 14.81	24.32 ± 17.83	0.518
CXCR4	49.64 ± 31.46	49.03 ± 40.74	0.895
Bcl-2	61.04 ± 46.58	35.02 ± 28.62	0.296

Tabla 2. Fenotipo de PCs en neonatos y adultos.

Posteriormente, quisimos evaluar el estado proliferativo de las PCs de neonatos humanos, utilizando un análisis del ciclo celular a través de una tinción de DNA con 7-AAD (7-amino-actinomicina-D) y el marcador de proliferación Ki67 (figura 17A). Los resultados mostraron una proporción mayor de PCs neonatales en estado de quiescencia o fase G0 del ciclo

celular y un menor porcentaje de células en fase de síntesis que en las células de adulto, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P=0.07$). Además, las PCs de adulto parecen tener un mayor porcentaje de células en fases activas del ciclo celular

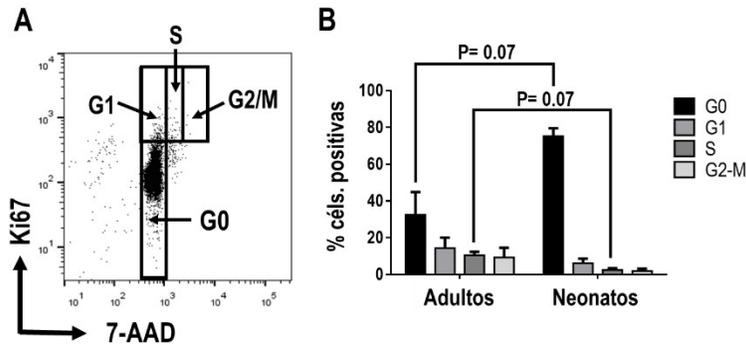


FIGURA 17 | Las PCs de neonatos y adultos presentan ligeras diferencias en las fases del ciclo celular. *Dot plot* representativo de citometría (A) mostrando la distribución de las fases del ciclo celular de acuerdo con el contenido de DNA por 7-AAD y el marcador de proliferación Ki67. Las células fueron analizadas a partir de PCs (CD138+CD38+) /Región de Linfocitos/ Singletes (figura B, Anexos). Los resultados revelaron diferencias en G0 (mayor porcentaje en neonatos) y fase S (menor en neonatos), aunque no son estadísticamente significativas, $P=0.07$. Los datos mostrados corresponden a un *pool* de 3-5 experimentos independientes, representan la media \pm SEM, y fueron analizados con una prueba de *t* de Mann-Whitney (B).

(G1, S y G2/M) comparadas con los neonatos (figura 17B), pudiendo indicar que dichas células continúan en proceso de diferenciación o son de reciente formación.

Finalmente, y por lo que se ha discutido anteriormente sobre la importancia de la médula ósea como nicho de las células plasmáticas, tuvimos la oportunidad de evaluar dos muestras humanas de médula ósea, una de adulto y una de neonato, en las cuales repetimos los experimentos realizados en sangre periférica, como pueden apreciarse en la figura 18. En el inciso A podemos observar la proporción de células CD138+CD38+Blimp-1+ en médula ósea, siendo $<0.03\%$ en adulto y $<0.01\%$ en neonato. Analizamos la intensidad media de fluorescencia del factor de transcripción Blimp-1 siendo de alrededor de 80% en la muestra de adulto y de aproximadamente 40% en la de neonato. Llevamos a cabo la tinción intracelular para detectar Igs citoplásmicas en las PCs, encontrando únicamente a la cadena ligera Kappa en estas muestras (figura 18C) y una mayor proporción de IgGs, tanto en la muestra de neonato como en adulto (figura 18D). Evaluamos los marcadores de PCs y

linfocitos B en las muestras, encontrando que una baja proporción de las muestras presentaron el factor de transcripción XBP-1, mientras que la molécula CD45 se expresa en el 100% de las células seleccionadas como PCs en neonatos, que expresan también alrededor de un 15% del correceptor CD19 y además un 90.9% del marcador de memoria, CD27. Alrededor de un 54% de las PCs neonatales expresan el receptor de quimiocinas, CXCR4 y el marcador de sobrevivencia, Bcl-2, la presencia de estos marcadores nos confirmaría el fenotipo de estas PCs (figura 18E). El perfil proliferativo de PCs en las muestras, mostró una proporción mayor de PCs neonatales en la fase G0 y una menor proporción de PCs en fases activas del ciclo celular comparadas con la muestra de adulto (figura 18F). Para concluir, evaluamos el marcador de secreción CD107a (LAMP-1), resultando en que las PCs de adulto presentaron una proporción mayor de esta molécula comparada con la muestra de neonato (aprox. 60% vs 20%) (figura18G). Estas evidencias nos dan un indicio acerca de que pueden encontrarse células plasmáticas en la médula ósea de neonatos humanos recién nacidos; sin embargo, se requiere un tamaño de muestra mayor para obtener resultados concluyentes al respecto y que posean validez estadística.

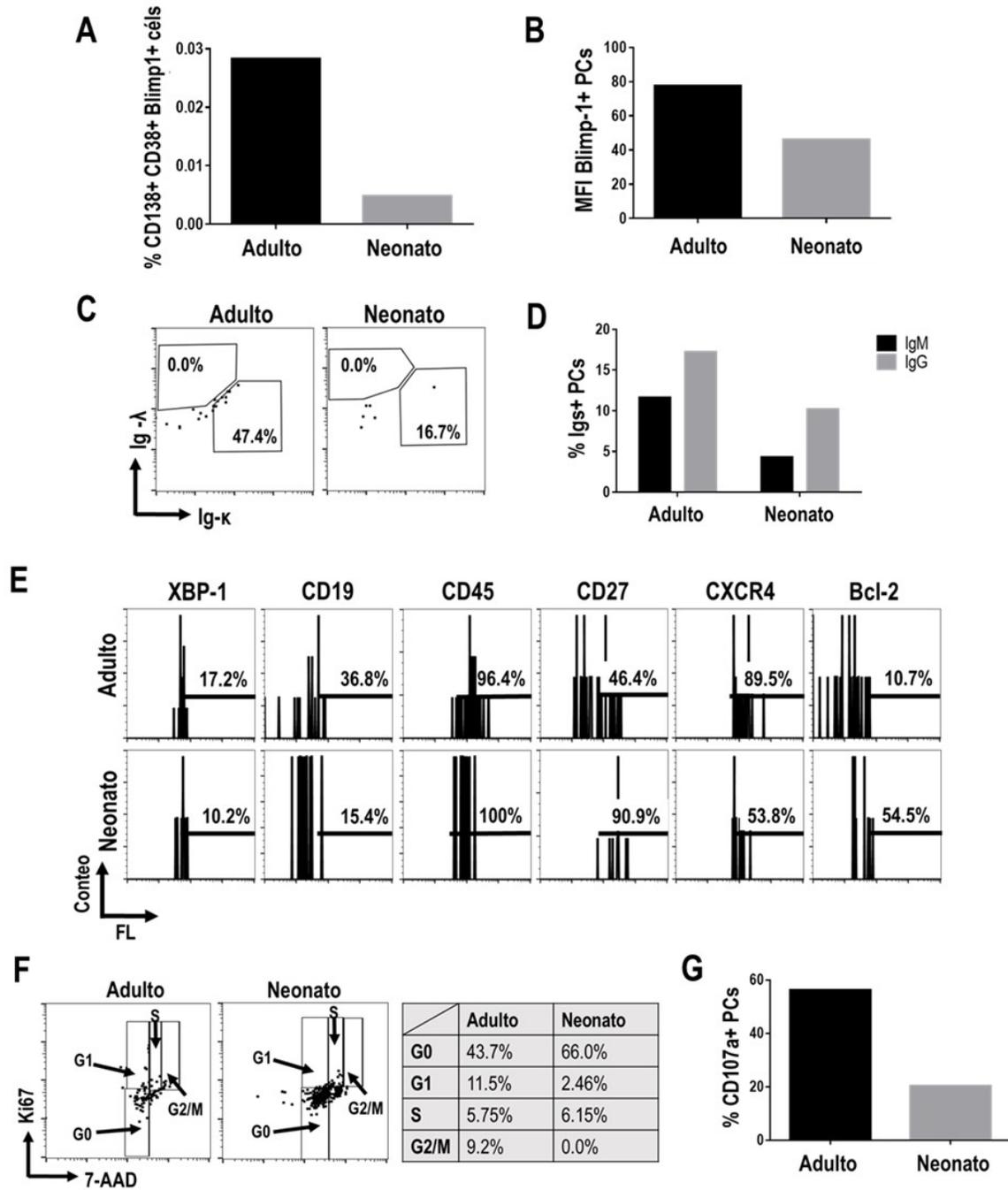


FIGURA 18 | PCs en muestras de médula ósea de neonato y adulto. Proporción de PCs (CD138+CD38+Blimp1+) en médula ósea (A). Expresión de Blimp-1 en PCs de médula ósea (B). Expresión de las cadenas ligeras de las Igs en PCs de médula ósea (C). Proporción de PCs IgM e IgG- positivas en muestra de médula ósea (D). Fenotipo de PCs de neonato y adulto en muestra de médula ósea (E). Evaluación de ciclo celular en PCs de neonato y adulto en médula ósea (F). Proporción de PCs CD107a-positivas en muestras de médula ósea de neonato y adulto. Las células fueron analizadas a partir de PCs (CD138+CD38+) /Región de Linfocitos/ Singletes (figura B, Anexos). Los datos mostrados corresponden a un experimento.

8. DISCUSIÓN

Este es uno de los pocos reportes que existen de células plasmáticas o productoras de anticuerpos durante el desarrollo post-natal temprano en neonatos murinos no inmunizados. Fuimos capaces de identificar células plasmáticas en neonatos de ratón desde el día 1 de nacimiento, basándonos en la detección mediante citometría de flujo propuesta por Tellier & Nutt [50], utilizando la combinación de las moléculas CD138 y CD98, un transportador de aminoácidos altamente expresado en ASCs. Este acercamiento permite identificar a esta población celular sin utilizar el ratón transgénico Blimp-1-GFP+, ya que prácticamente todas las células marcadas con el reportero de GFP y positivas para CD138, son también positivas para CD98 [50].

En nuestro estudio observamos que las PCs neonatales incrementaron gradualmente su proporción y número a través del tiempo hasta casi alcanzar el nivel de los individuos adultos, excepto por el caso del ganglio linfático mesentérico donde las proporciones permanecieron constantes a través del tiempo y en la médula ósea donde hubo un claro incremento a partir de los 7 días de edad. Las PCs neonatales expresan el factor de transcripción Blimp-1 en altas proporciones, confirmando de esta manera su fenotipo de células plasmáticas. Interesantemente, las PCs de adulto en la médula ósea mostraron una reducción significativa en la proporción de células Blimp-1 positivas, comparadas con los neonatos de los días 4 y 14, lo que pudiera ser explicado por el hecho de que la activación de Blimp-1 es esencial para el establecimiento del transcriptoma de célula plasmática pero en PCs completamente maduras, su identidad es mantenida independiente de la activación de este factor de transcripción [53].

Las PCs neonatales mantienen la expresión de los marcadores de linfocitos B, B220 y CD19, probablemente debido al hecho de estas células fueron analizadas en condiciones basales, dado que las células plasmáticas de adultos también presentaron estos marcadores hasta cierto punto en su superficie celular; en comparación con la mayoría de los estudios en los que se introduce un antígeno experimental o vacunal para inducir la activación de células B y la subsecuente generación de células productoras de anticuerpos. Anteriormente Chernova et al. [54], reportaron la expresión de B220 en células plasmáticas. De acuerdo

con la expresión de B220 y de la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), se identificaron 3 subpoblaciones en médula ósea: a) células B220 positivas correspondiente a PCs de vida corta y recientemente formadas, b) células plasmáticas B220 negativas con un tiempo de vida de 2-3 meses y c) una población relativamente rara de células plasmáticas B220 negativas de vida larga. Lo anterior demostró el dinamismo y heterogeneidad de las PCs en médula ósea, que incluye una proporción sustancial de PCs recién generadas. Además, la heterogeneidad del fenotipo en PCs se ha descrito en humanos, donde la expresión de moléculas tales como CD45, CD19 y HLA-DR sigue presente en PCs [4, 55], y parecen estar asociados a PCs de vida larga, puesto que se ha reportado la expresión de estos marcadores en médula ósea [6, 8]. Apoyando estas ideas, nuestros resultados mostraron una gran proporción de PCs neonatales que expresan el marcador de proliferación Ki67, incluso en médula ósea, reconocido como el nicho por excelencia de células plasmáticas terminalmente diferenciadas y no proliferantes [8, 11, 56], lo cual indica que estas células están en las primeras etapas del arresto de ciclo celular y por ello conservan la expresión de esta proteína nuclear [57] o son de reciente generación y continúan en el proceso de diferenciación.

Con respecto a la distribución de las PCs neonatales pudimos demostrar por inmunofluorescencia, su presencia *in situ* a través de la tinción doble de inmunoglobulinas citoplásmicas y CD138. A pesar de la sensibilidad restringida de esta técnica, fuimos capaces de encontrar PCs en el MLN tan pronto como a los 4 días de edad de los neonatos y en el día 7 en el resto de los órganos analizados. Como era de esperarse, el isotipo predominante en estas células en neonatos fue IgM, sin embargo, a partir del día 7 fueron observadas algunas PCs IgG positivas en los 3 órganos y algunas PCs IgA positivas en el bazo y el MLN. Estos resultados correlacionan con los obtenidos a través de citometría de flujo, donde las inmunoglobulinas predominantes encontradas en el citoplasma de las células CD138+ CD98+ fueron también del isotipo IgM, seguidas de IgG e IgA. Las proporciones de inmunoglobulinas en PCs fueron similares a través del tiempo, excepto por el incremento significativo de PCs IgG-positivas en bazo al día 4, comparado con el resto de las edades analizadas, el incremento en la proporción de PCs IgM- positivas en el MLN de adulto y la

proporción que es muy similar entre las PCs al día uno y en el adulto, es en conjunto mayor que la observada en las otras edades en médula ósea.

Hasta el momento, hemos demostrado que los neonatos en sus primeras etapas del desarrollo presentan células con características de tipo plasmablasto o células plasmáticas, sin embargo, su capacidad efectora debía ser evaluada también. Por lo cual, en los ensayos de ELISPOT, encontramos que las PCs neonatales son capaces de secretar inmunoglobulinas incluso desde el día 1 de edad y como era de esperarse, el isotipo más representado fue IgM como se vio con anterioridad a través de citometría e inmunofluorescencia. Sorpresivamente, en neonatos de un día de edad, encontramos células productoras de anticuerpos que secretan una cantidad discreta, pero perceptible de las 3 inmunoglobulinas. Todos estos resultados demuestran indudablemente que los neonatos presentan plasmablastos/células plasmáticas y que éstas son funcionales, desde las primeras etapas del desarrollo post-natal de los ratones neonatos.

Las evidencias encontradas hacen que surjan varios cuestionamientos, uno de los principales sería elucidar de dónde provienen estas células plasmáticas y contra qué antígenos es que fueron generadas. Las células plasmáticas surgen a partir de la activación de los linfocitos B, los cuales se dividen en 3 tipos principales: linfocitos B foliculares o B2, linfocitos B de zona marginal y linfocitos B1, siendo estos dos últimos los que generalmente responden a antígenos de tipo T-independiente a través de reacciones extrafoliculares. Al activarse, los linfocitos B1 o de zona marginal, generan anticuerpos de manera rápida [13], lo cual podría explicar la presencia de PCs durante los primeros días después del nacimiento (día 1-4) de los neonatos. Es poco probable que, por su tamaño y complejidad, las PCs maternas atraviesen la barrera placentaria para llegar al producto durante la etapa de gestación, una explicación que podríamos proponer, es que las PCs encontradas al día 1 del nacimiento en los murinos se hayan generado en respuesta a autoantígenos, por ejemplo, N-Acetil-glucosamina (GlcNAc), presente en células apoptóticas en estado de senescencia o modificaciones postraduccionales en la superficie de neuronas [58], aunque se requiere de más evidencia para probar esta hipótesis. Otra alternativa que podríamos proponer en este aspecto y cuya evidencia es creciente en la actualidad, es la activación que generan los

antígenos derivados de la microbiota colonizante, los cuales son capaces de seleccionar el repertorio de linfocitos B1, resultando en la producción de anticuerpos IgM en neonatos de 14 días de edad [59]. Además, es importante tomar en cuenta que en el tamizaje preliminar que llevamos a cabo para identificar células B de centro germinal, fuimos capaces de identificar células con el fenotipo B220+PNA+Bcl-6+Fas+ en el bazo y MLN de neonatos a los días 4 y 7 después del nacimiento, lo que podría añadir evidencia de que las PCs que encontramos no sólo provienen de reacciones extrafoliculares, sino también podrían ser el resultado de la activación de centros germinales en estos individuos. Estas últimas observaciones de cierta forma apoyan lo encontrado por Rechavi y colaboradores [44], donde incluso puede encontrarse evidencia de hipermutación somática y cambio de isotipo *in utero* en fetos humanos desde las 12 semanas de gestación, a través de la secuenciación de fragmentos de los genes que codifican para las cadenas pesadas de las Igs, aunque la mayoría de los transcritos encontrados codifican para IgM y hasta el tercer trimestre se encuentran transcritos que codifican para la cadena pesada gamma; lo cual explica la aparición temprana de células productoras de anticuerpos IgM y de IgG e IgA en menor proporción. Otra posibilidad del origen de PCs neonatales es la transferencia de complejos inmunes (IC) junto con IgG maternas. Al ser transferidos estos complejos, los antígenos una vez en el cuerpo del feto pueden ser capaces de estimular la respuesta inmune del producto y generar IgM+-PCs que reconozcan a dichos antígenos [60, 61].

Recientemente Aradottir *et al.* (2022) analizaron las poblaciones de plasmablastos y células plasmáticas de ratones neonatos a partir de la primera semana de vida en condiciones basales, con la finalidad de comparar dichas poblaciones después de la inmunización de individuos con vacunas proteicas de toxoide tetánico (TT) y diferentes adyuvantes. Encontraron que la expresión de CD138 era menor en neonatos comparada con las PCs de adultos y además reportaron que la expresión de APRIL, un factor crítico para la sobrevivencia de las PCs está expresado en menor proporción en neonatos, pero IL-6 se encuentra en mayor proporción en los neonatos durante las primeras 3 semanas de vida. APRIL e IL-6 son secretados por células accesorias de la médula ósea y permiten que las PCs persistan al recibir estos factores; sin embargo, en los neonatos hay una reducción en la

cantidad de células accesorias [62], lo que podría explicar las respuestas transitorias de Abs durante esta etapa del desarrollo [63]. Sin embargo, al inmunizar a los individuos, reportaron un aumento en la formación de GC y en la maduración de células dendríticas foliculares (FDCs) [64], un incremento en las moléculas de activación en los linfocitos B, resultando en la generación de plasmablastos/células plasmáticas en bazo y su sobrevivencia en médula ósea, en respuesta al conjugado de neumococo vacunal (Pnc1-TT) con o sin la presencia del adyuvante LT-K63 [65]. Esto demostró que los neonatos son capaces de lograr respuestas de larga vida a las vacunas como las que se observan en organismos adultos.

Después de haber analizado en el modelo murino la presencia de células plasmáticas, decidimos evaluar esta población en sangre de cordón umbilical y en donadores humanos sanos. Cabe señalar que como en el caso de los estudios en ratón, son pocos los trabajos que se enfocan a estudiar a esta población con un mínimo de parámetros de identificación válidos en adultos sanos [66] y los que existen presentan ciertas limitaciones técnicas, como lo es, suscribir la identificación a la expresión de CD138 o a la ausencia de marcadores de linfocitos B. Además, buena parte de esos trabajos son realizados después de inmunizar a los individuos con alguna vacuna [47, 67, 68] o adyuvante [64, 65], para incrementar la proporción de células en sangre periférica; o bien, aíslan linfocitos B para estimularlos y evaluar la producción de ASCs *in vitro* [30, 31, 69, 70]. Es por ello que, en nuestro estudio, decidimos hacer una selección más restrictiva de esta población celular, considerando tres marcadores de identificación: CD138, CD38 y Blimp-1. Bajo este criterio, fuimos capaces de identificar PCs en neonatos humanos sanos en una proporción muy similar a la de los controles de adultos.

Una característica importante de las células plasmáticas es la clonalidad, ya que un linfocito B o célula plasmática expresa en las Igs, la cadena ligera kappa o lambda. Está bien documentado que en adultos humanos, existe un uso preferencial de la cadena ligera kappa en las Igs [71], traducido en un 60% de linfocitos B que expresan la cadena kappa y 40% la cadena lambda. La evaluación de las cadenas ligeras es clave para la caracterización de los

mielomas múltiples y gamopatías monoclonales no determinadas en pacientes oncológicos [72, 73], por lo que decidimos evaluar si existía alguna preferencia en neonatos por alguna de las dos cadenas ligeras. Interesantemente, los resultados en neonatos mostraron lo contrario a lo reportado en adultos, hay una preferencia en el uso de las cadenas ligeras lambda, sobre las cadenas ligeras kappa. Esta observación concuerda a lo reportado en Skvaril y colaboradores [74] donde se encontró una concentración significativamente mayor de cadenas ligeras lambda en el suero de recién nacidos y niños pequeños, comparada con la cantidad de ésta en suero de adultos.

La activación del factor de transcripción XBP-1 es un requisito indispensable para la diferenciación de LcB hacia PC, ya que aunque los LcB se desarrollan normalmente en ausencia de esta proteína, secretan muy pocos Abs en condiciones basales o en respuesta a Ags T-independientes o T-dependientes [23, 24]. Por esta razón, evaluamos XBP-1 en las PCs de neonatos humanos. Este factor de transcripción está presente en la mayoría de las PCs analizadas, tanto en neonatos como en adultos y su expresión es muy similar en ambas cohortes, lo cual nos sugiere que las PCs encontradas son maduras y están funcionalmente activas.

Por otro lado, encontramos que tanto las PCs humanas neonatales como de donadores adultos, presentan marcadores asociados a LcB como CD19 y CD45, que como discutimos anteriormente, sugiere que estas células aún se encuentran en proceso de diferenciación, o bien, podrían ser indicativo de PCs de vida larga re-circulantes provenientes de médula ósea, residentes de tejidos linfoides asociados a la mucosa del intestino (GALT) o del bazo, como se ha reportado en individuos adultos [6, 66]. Interesantemente, las PCs neonatales presentaron en su membrana una proporción menor de CD19, lo que podría hablarnos de un estado más avanzado de diferenciación en comparación con las de adulto. Los resultados también mostraron que la mitad de las PCs que analizamos expresan CXCR4, receptor de quimiocinas importante para la migración celular, lo cual podría indicar que están en proceso de migrar a su nicho de PCs y puesto que también expresan el marcador de

sobrevivencia Bcl-2, requisito indispensable para que no sufran muerte por apoptosis. Contrario a lo reportado por Caraux y cols. [6], donde describen que las PCs CD138-/CD138+ humanas expresan intensamente el marcador CD27, nosotros encontramos que esta glicoproteína se encuentra presente tan sólo en alrededor del 20% de la población analizada; a su vez, este grupo de trabajo reportó que CXCR4 estaba expresado en menor proporción en PCs que en LcB en condiciones basales; sin embargo, estas discrepancias pueden deberse a la selección de la población que ellos emplearon en el cual consideraron a las células CD20-CD38++ como células plasmáticas con o sin la presencia de CD138 en su membrana.

Como se ha discutido anteriormente, un indicio de la madurez de las PCs, es su estado proliferativo y en este caso, encontramos, de forma muy interesante, que las PCs obtenidas de cordón umbilical tienen una mayor proporción de PCs en fase G0 comparadas con las de circulación de adultos y también, una proporción menor de células en fase de síntesis activa del ciclo celular, lo que sugiere que las células de neonatos se encuentran en un estado de diferenciación más avanzado que las de los adultos. Cabe señalar, que se ha reportado que las PCs en humanos despliegan un fenotipo altamente activado, asociado a la alta expresión de la molécula de proliferación Ki67 [6], probablemente debido a que se encuentran en circulación y son células de reciente formación, o bien, recirculantes.

En la bibliografía ha habido varios esfuerzos por caracterizar las células residentes de la médula ósea [66, 75], incluso más recientemente se han tratado de establecer valores de referencia de la cantidad de células plasmáticas en médula ósea de individuos a lo largo de la vida [76], sin embargo, estos esfuerzos se ven limitados por la cantidad de marcadores que se utilizan para identificar a las PCs. Por otro lado, los estudios donde se caracteriza más a fondo a esta población se realizan en individuos con alguna infección [77], después de haber recibido alguna vacuna [67, 78] o con mieloma múltiple [27, 55, 72, 79, 80], dejando de lado la identificación y caracterización de células provenientes de individuos sanos. Es por ello que, como parte de las perspectivas derivadas de este proyecto, surgió la

posibilidad de analizar 2 muestras de médula ósea de donadores sanos, donde pudimos encontrar PCs en la médula de recién nacido. El fenotipo de las PCs neonatales de médula ósea CD138+ CD38+ Blimp-1+, fueron CD45+ en su totalidad, con una proporción baja de CD19 y XBP-1, una expresión alta de CD27 y alrededor del 50% de la población expresó CXCR4 y Bcl-2. Interesantemente, las PCs neonatales presentaron una proporción mayor de IgG que de IgM en su citoplasma y todas fueron Ig-κ-positivas. Las PCs neonatales se ubicaron en fase de arresto celular, en mayor proporción que las PCs de médula ósea de adulto que además presentaron mayor proporción de células en fases activas del ciclo celular, sugiriendo nuevamente un estado de diferenciación más avanzado en las PCs provenientes de neonatos. La expresión baja de XBP-1 parece estar asociada a la proporción baja de células que presentaron la proteína de vesículas de secreción, CD107a en médula ósea de neonatos. La colección de estos hallazgos resulta muy interesante, por lo que requieren ser evaluados a mayor profundidad, utilizando un número de muestra adecuado que pueda proporcionar resultados significativos y concluyentes.

9. CONCLUSIONES

Las PCs son una población escasa pero fundamental para el establecimiento de la inmunidad humoral en los individuos. En el presente trabajo fuimos capaces de identificar células plasmáticas secretoras de anticuerpos, desde las 24 horas de vida de los ratones neonatos. La presencia de estas células, que además presentan características fenotípicas y secretorias similares a las de individuos adultos, contribuye a la evidencia a favor de que el sistema inmune de los neonatos está preparado para responder a los estímulos antigénicos a los que se encuentre; sin embargo, urge la estandarización de un método de identificación que permita caracterizar a las células con un criterio mejor definido y en condiciones basales.

El presente trabajo aporta datos importantes sobre la biología de esta población celular, aunque falta conocer los mecanismos por los cuales estas células son generadas en los neonatos, principalmente la reactividad de dichas células. Conocer estos mecanismos, puede ser muy útil para guiar el diseño de intervenciones basadas en la inmunología, como

el diseño y aplicación de vacunas en las primeras etapas del desarrollo humano o el tratamiento contra alergias.

Aparición temprana de Células Plasmáticas (CD138+CD98+) funcionales en ratones neonatos no inmunizados

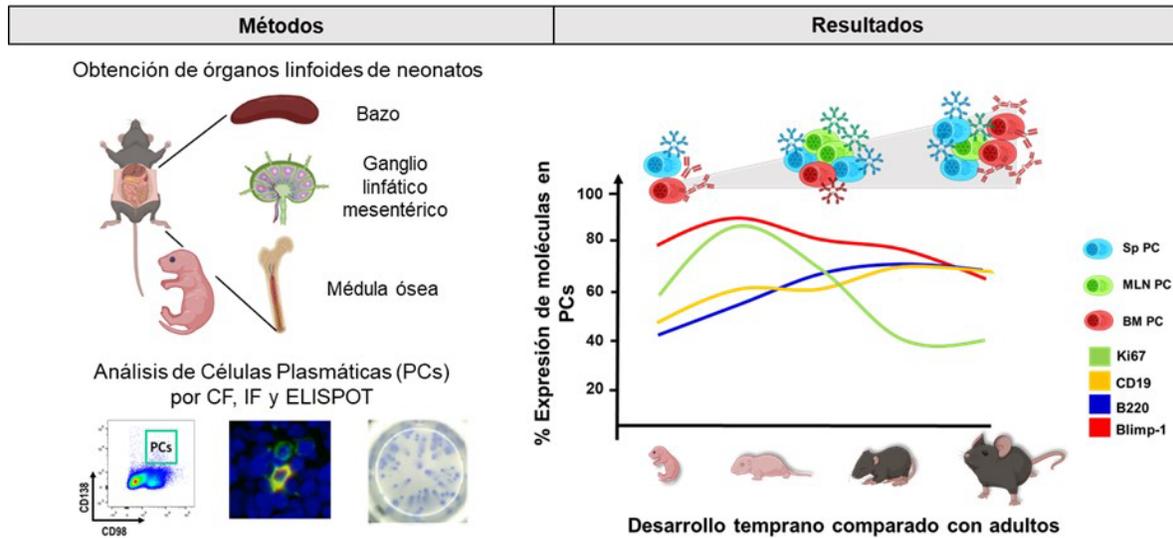


FIGURA 19 | Representación gráfica de los resultados obtenidos en ratones neonatos. La imagen representa del lado izquierdo los métodos de análisis utilizados, mientras que de lado derecho se esquematiza el incremento gradual de la población de PCs (CD138+CD98+) durante las primeras etapas del desarrollo del ratón, así como la expresión de marcadores importantes como Blimp-1, B220, CD19 y Ki67 y la producción de Igs de los diferentes isotipos evaluados.

10. PERSPECTIVAS

Algunas de las perspectivas a desarrollar a partir de este trabajo son ampliar la caracterización de las PCs encontradas en ratones neonatos, incluyendo la expresión de moléculas de *homing* como CXCR4 o de supervivencia, Bcl-2 y Mcl-1.

Otro factor importante por investigar sería elucidar de dónde provienen los antígenos contra los cuales se están generando estas PCs (alimentos, microbiota, autoantígenos, antígenos ambientales).

Determinar si las PCs encontradas provienen de reacciones extrafoliculares o de reacción de centro germinal, mediante el análisis de hipermutación somática en los genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas, puede ser un dato clave para tener una mejor idea de los mecanismos de generación de las PCs.

Finalmente, ampliar el número de muestras de médula ósea en neonatos sanos para poder analizar y caracterizar la población de PCs presente en estos individuos, ya que nuestros indicios sugieren que esta población podría poseer un fenotipo diferente al observado en periferia.

11. LITERATURA CITADA

1. Minges Wols, H.A., *Plasma Cells*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
2. Nutt, S.L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(3): p. 160-71.
3. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. *Immunol Rev*, 2010. **237**(1): p. 140-59.
4. Medina, F., et al., *The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression*. *Blood*, 2002. **99**(6): p. 2154-61.
5. Calame, K.L., K.I. Lin, and C. Tunyaplin, *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 205-30.
6. Caraux, A., et al., *Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells*. *Haematologica*, 2010. **95**(6): p. 1016-20.
7. Lugar, P.L., et al., *Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e44362.
8. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 741-50.
9. Tarlinton, D., et al., *Plasma cell differentiation and survival*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(2): p. 162-9.
10. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. *Nat Med*, 2003. **9**(9): p. 1131-7.
11. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 363-72.
12. Sze, D.M., et al., *Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival*. *J Exp Med*, 2000. **192**(6): p. 813-21.
13. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(3): p. 230-42.

14. Roco, J.A., et al., *Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers*. *Immunity*, 2019. **51**(2): p. 337-350 e7.
15. Calame, K.L., *Plasma cells: finding new light at the end of B cell development*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(12): p. 1103-8.
16. Liu, X., et al., *Heterogeneous plasma cells and long-lived subsets in response to immunization, autoantigen and microbiota*. *Nat Immunol*, 2022. **23**(11): p. 1564-1576.
17. Wagner, S.D. and M.S. Neuberger, *Somatic hypermutation of immunoglobulin genes*. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 441-57.
18. Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
19. Rousset, F., et al., *Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1890-3.
20. Kallies, A., et al., *Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression*. *J Exp Med*, 2004. **200**(8): p. 967-77.
21. Kallies, A., et al., *Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1*. *Immunity*, 2007. **26**(5): p. 555-66.
22. Shaffer, A.L., et al., *XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation*. *Immunity*, 2004. **21**(1): p. 81-93.
23. Reimold, A.M., et al., *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1*. *Nature*, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
24. Iwakoshi, N.N., et al., *Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 321-9.
25. Malavasi, F., et al., *Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(3): p. 841-86.
26. Roccatello, D., et al., *CD38 and Anti-CD38 Monoclonal Antibodies in AL Amyloidosis: Targeting Plasma Cells and beyond*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
27. Paiva, B., et al., *Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. **78**(4): p. 239-52.
28. Burgio, G.R., A.G. Ugazio, and L.D. Notarangelo, *Immunology of the neonate*. *Curr Opin Immunol*, 1989. **2**(5): p. 770-7.
29. Schelonka, R.L. and A.J. Infante, *Neonatal immunology*. *Semin Perinatol*, 1998. **22**(1): p. 2-14.
30. Tosato, G., et al., *B cell differentiation and immunoregulatory T cell function in human cord blood lymphocytes*. *J Clin Invest*, 1980. **66**(2): p. 383-8.
31. Tucci, A., et al., *Are cord blood B cells functionally mature?* *Clin Exp Immunol*, 1991. **84**(3): p. 389-94.
32. Hayward, A.R. and A.R. Lawton, *Induction of plasma cell differentiation of human fetal lymphocytes: evidence for functional immaturity of T and B cells*. *J Immunol*, 1977. **119**(4): p. 1213-7.
33. Wu, L.Y., et al., *Ontogeny of B-lymphocyte differentiation induced by pokeweed mitogen*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1976. **5**(2): p. 208-17.

34. Durandy, A., et al., *Phenotypic and functional characteristics of human newborns' B lymphocytes*. J Immunol, 1990. **144**(1): p. 60-5.
35. Durandy, A., et al., *Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns*. J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1560-8.
36. Tasker, L. and S. Marshall-Clarke, *Functional responses of human neonatal B lymphocytes to antigen receptor cross-linking and CpG DNA*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(3): p. 409-19.
37. Wittenbrink, N., et al., *Exposure to environmental antigens induces the development of germinal centers in premature neonates*. Dev Immunol, 2002. **9**(3): p. 177-9.
38. Weitkamp, J.H., et al., *Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4680-8.
39. Weitkamp, J.H., et al., *Natural evolution of a human virus-specific antibody gene repertoire by somatic hypermutation requires both hotspot-directed and randomly-directed processes*. Hum Immunol, 2005. **66**(6): p. 666-76.
40. Mortari, F., et al., *The human cord blood antibody repertoire. Frequent usage of the VH7 gene family*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 241-5.
41. Raaphorst, F.M., et al., *Restricted utilization of germ-line VH3 genes and short diverse third complementarity-determining regions (CDR3) in human fetal B lymphocyte immunoglobulin heavy chain rearrangements*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 247-51.
42. Schroeder, H.W., Jr., J.L. Hillson, and R.M. Perlmutter, *Early restriction of the human antibody repertoire*. Science, 1987. **238**(4828): p. 791-3.
43. Williams, J.V., et al., *The human neonatal B cell response to respiratory syncytial virus uses a biased antibody variable gene repertoire that lacks somatic mutations*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 407-14.
44. Rechavi, E., et al., *Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development*. Sci Transl Med, 2015. **7**(276): p. 276ra25.
45. Ridings, J., et al., *Somatic hypermutation of immunoglobulin genes in human neonates*. Clin Exp Immunol, 1997. **108**(2): p. 366-74.
46. Kolar, G.R., et al., *Human fetal, cord blood, and adult lymphocyte progenitors have similar potential for generating B cells with a diverse immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2981-7.
47. Bona, C., D. Radu, and T. Kodera, *Molecular studies on the diversification of hemagglutinin-specific human neonatal repertoire subsequent to immunization with naked DNA*. Vaccine, 2004. **22**(13-14): p. 1624-30.
48. Prabakaran, P., et al., *Expressed antibody repertoires in human cord blood cells: 454 sequencing and IMGT/HighV-QUEST analysis of germline gene usage, junctional diversity, and somatic mutations*. Immunogenetics, 2012. **64**(5): p. 337-50.
49. Munguia-Fuentes, R., et al., *Immunization of Newborn Mice Accelerates the Architectural Maturation of Lymph Nodes, But AID-Dependent IgG Responses Are Still Delayed Compared to the Adult*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 13.

50. Tellier, J. and S.L. Nutt, *Standing out from the crowd: How to identify plasma cells*. Eur J Immunol, 2017. **47**(8): p. 1276-1279.
51. Vignon, C., et al., *Flow cytometric quantification of all phases of the cell cycle and apoptosis in a two-color fluorescence plot*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68425.
52. Shinall, S.M., et al., *Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5729-38.
53. Tellier, J., et al., *Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response*. Nat Immunol, 2016. **17**(3): p. 323-30.
54. Chernova, I., et al., *Lasting antibody responses are mediated by a combination of newly formed and established bone marrow plasma cells drawn from clonally distinct precursors*. J Immunol, 2014. **193**(10): p. 4971-9.
55. Liu, D., et al., *Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma*. J Clin Pathol, 2012. **65**(9): p. 823-9.
56. Halliley, J.L., et al., *Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow*. Immunity, 2015. **43**(1): p. 132-45.
57. Sun, X. and P.D. Kaufman, *Ki-67: more than a proliferation marker*. Chromosoma, 2018. **127**(2): p. 175-186.
58. Kirvan, C.A., et al., *Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 914-20.
59. New, J.S., et al., *Neonatal Exposure to Commensal-Bacteria-Derived Antigens Directs Polysaccharide-Specific B-1 B Cell Repertoire Development*. Immunity, 2020. **53**(1): p. 172-186 e6.
60. Albrecht, M. and P.C. Arck, *Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 555.
61. Niewiesk, S., *Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 446.
62. Aradottir Pind, A.A., et al., *A comparative study of adjuvants effects on neonatal plasma cell survival niche in bone marrow and persistence of humoral immune responses*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 904415.
63. Siegrist, C.A. and R. Aspinall, *B-cell responses to vaccination at the extremes of age*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 185-94.
64. Aradottir Pind, A.A., et al., *Adjuvants Enhance the Induction of Germinal Center and Antibody Secreting Cells in Spleen and Their Persistence in Bone Marrow of Neonatal Mice*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2214.
65. Aradottir Pind, A.A., et al., *LT-K63 Enhances B Cell Activation and Survival Factors in Neonatal Mice That Translates Into Long-Lived Humoral Immunity*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 527310.
66. Pellat-Deceunynck, C. and R. Bataille, *Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**(2): p. 293-301.

67. Piepenbrink, M.S., et al., *Broad and Protective Influenza B Virus Neuraminidase Antibodies in Humans after Vaccination and their Clonal Persistence as Plasma Cells*. mBio, 2019. **10**(2).
68. Saso, A. and B. Kampmann, *Vaccine responses in newborns*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(6): p. 627-642.
69. Jourdan, M., et al., *An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization*. Blood, 2009. **114**(25): p. 5173-81.
70. Jourdan, M., et al., *Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation*. J Immunol, 2011. **187**(8): p. 3931-41.
71. Abbas AK, L.A., Pillai S, *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. 2012, United States of America: ELSEVIER Saunders.
72. Bataille, R., et al., *The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy*. Haematologica, 2006. **91**(9): p. 1234-40.
73. Ocueteau, M., et al., *Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1655-65.
74. Skvaril, F., et al., *[Changes of kappa/lambda ratio of human serum immunoglobulins in the course of development]*. Blut, 1976. **33**(4): p. 281-4.
75. Chapple, M.R., I.C. MacLennan, and G.D. Johnson, *A phenotypic study of B lymphocyte subpopulations in human bone marrow*. Clin Exp Immunol, 1990. **81**(1): p. 166-72.
76. Liang, J., et al., *Automated enumeration of lymphoid and plasma cells in bone marrow to establish normal reference ranges*. J Clin Pathol, 2018. **71**(10): p. 916-925.
77. Turner, J.S., et al., *SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans*. Nature, 2021. **595**(7867): p. 421-425.
78. Koutsakos, M. and A.H. Ellebedy, *The rise and fall of bone marrow plasma cells after influenza vaccination*. Immunol Cell Biol, 2021. **99**(2): p. 130-132.
79. Lin, P., et al., *Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(4): p. 482-8.
80. Corre, J. and M. Roussel, *Crowded bone marrow plasma cells*. Blood, 2020. **135**(1): p. 79.

12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

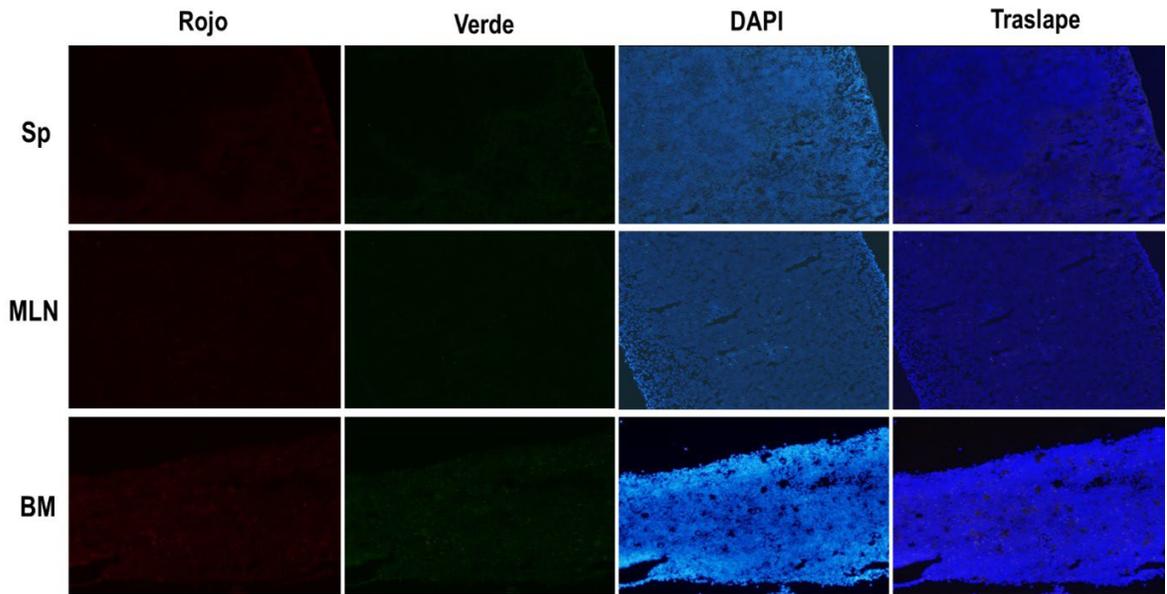


FIGURA 1S | Controles de isotipo de inmunofluorescencia de tejidos de ratón. Imágenes representativas de la tinción de control de isotipo para cada tejido (Sp: bazo. MLN: ganglio linfático mesentérico. BM: médula ósea). Estas imágenes muestran la fluorescencia de fondo en los tejidos analizados.

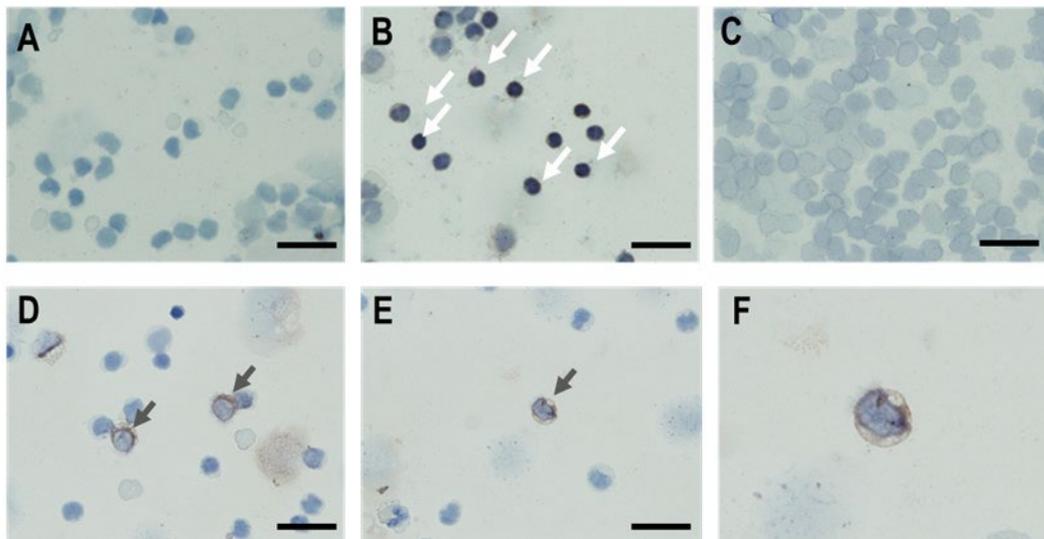


FIGURA 2S | Células CD138+ en muestras de sangre de cordón umbilical, pero no en sangre periférica de adultos. Imágenes representativas de tinciones de inmunocitoquímica con peroxidasa de muestras de humano procesadas en Cytospin. (A) Control de isotipo, (B) Control positivo de CD45 (flechas blancas), (C) muestra de sangre periférica de adulto sano, (D y E) células CD138+ (flechas negras) en sangre de cordón umbilical, (F) acercamiento digital de E para apreciar más detalles. Barra de escala = 50 μ m, aumento 60x.

13. ANEXOS

Tabla 1. Lista de Anticuerpos anti-Ratón para identificación PCs

Anticuerpo	Fluorocromo/ Enzima	Isotipo	Host	Concentración	Marca	No. de catálogo	Dilución
CD138	PE	IgG2a, kappa	Rata	0.2 mg/mL	BD Pharmingen	553714	1:300
CD138	Purificado	IgG2a, kappa	Rata	0.5 mg/mL	BD Biosciences	553712	1:100 (IF)
CD98	BV421	IgG2a, kappa	Rata	0.2 mg/mL	BD Biosciences	744831	1:400
B220/CD45R	FITC	IgG2a, kappa	Rata	0.5 mg/mL	BD Pharmingen	553088	1:100
CD19	PE-Cy5	IgG2a, kappa	Rata	0.2 mg/mL	eBiosciences	15-0193-83	1:600
Blimp-1	Purificado	IgG1	Rata	1.2 mg/mL	Abcam	Ab81961	0.5 µL
Ki67	Purificado	IgG policlonal	Conejo	0.5 mg/mL	Abcam	Ab66155	1:400
IgM	Biotinilado	Cadena pesada de IgM	Chivo	0.5 mg/mL	Southern Biotech	1020-08	1:500 (FC) 1:1000 (IF)
IgG	FITC	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and IgG3	Chivo	1.0 mg/mL	Southern Biotech	1030-02	1:400 (FC) 1:600 (IF)
IgA	Biotinilado	IgG1, kappa	Rata	0.5 mg/mL	eBioscience	13-5994-82	1:1000
Anti-conejo	AF488	IgG	Chivo	2 mg/mL	Invitrogen	A11008	1:1200
Anti-rata	AF594	IgG	Burro	2 mg/mL	Life Technologies ThermoFisher Scientific	A-21209	1:2000 (FC) 1:200 (IF)
Estreptavidina AF647	AF647	N/A	N/A	2.0 mg/mL	Life Technologies ThermoFisher Scientific	S32357	1:4000

Estreptavidina Texas Red	Texas Red	N/A	N/A		BRL	9540SA	1:1500
Estreptavidina AF488	AF488	N/A	N/A	1 mg/mL	Life Technologies ThermoFisher Scientific	S11223	1:2000
Control de Isotipo IgG rata	Purificado	IgG molécula completa	Chivo	20 mg/mL	Jackson Laboratories	012-000-003	1:100
4', 6- diamidino-2- fenilindol (DAPI)	Azul	Surco menor de DNA de doble cadena	N/A	10 mg	Invitrogen	62247	1:2000
IgM Ab secundario	AP	IgG policlonal	Chivo	Específica de lote	Southern Biotech	102004	1:1500
IgG Ab secundario	AP	IgG policlonal	Chivo	Específica de lote	Southern Biotech	103004	1:1500
IgA Ab secundario	AP	IgG policlonal	Chivo	Específica de lote	Southern Biotech	104004	1:1500
Anti-GAM	Purificado				Zymed	62-6410	1:1200

Tabla 2. Lista de Anticuerpos anti-Humano para identificación PCs

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Host	Concentración	Marca	No. de catálogo	Dilución
CD19	APC-H7	IgG1, kappa	Ratón	0.05 mg/mL	BD Biosciences	560177	0.5 µL
CD27	PerCP-Cy5.5	IgG1	Ratón		BD Biosciences	655429	0.3 µL
CD38	PE Cy7	IgG1, kappa	Ratón	0.05 mg/mL	Biolegend	356608	0.3 µL
CD45	Pacific Orange	IgG1, kappa	Ratón	0.2 mg/mL	Invitrogen	1662854B	0.5 µL
CD138	BV421	IgG1, kappa	Ratón	0.12 mg/mL	Biolegend	356516	0.5 µL
BCL-2	AF647	IgG1, kappa	Ratón	0.1 mg/mL	Biolegend	658706	0.3 µL
CXCR4	PE-Cy5	IgG2a, kappa	Ratón	0.2 mg/mL	Biolegend	306508	0.3 µL
HLA-DR	PE-Cy7	IgG1, kappa	Ratón	0.05 mg/mL	BD Biosciences	335813	0.3 µL

Kappa LC	APC	IgG1, kappa	Ratón	0.012 mg/mL	Biologend	316510	
Ki67	PE	IgG1, kappa	Ratón	0.05 mg/mL	Biologend	350504	0.3 µL
Lambda LC	PE	IgG2a, kappa	Ratón	0.02 mg/mL	Biologend	316608	
XBP1s	PE	IgG2a, kappa	Ratón	0.003 mg/mL	Biologend	657504	3 µL
Blimp-1	Alexa Fluor 488	IgG1, kappa	Ratón	100 pruebas	R&D Systems	555797	3 µL
Lambda LC	PE	IgG1, kappa	Ratón	100 pruebas	BD Biosciences	561323	2 µL
Kappa LC	APC	IgG1, kappa	Ratón	50 pruebas	BD Biosciences	560177	2 µL
7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD)	FL3 650 nm LP filter	N/A	DNA	100 pruebas	BD Biosciences	559925	5 µL

Tabla 3. Lista de Anticuerpos para inmunofluorescencia en tejidos de ratón

Anticuerpo	Isotipo	Marca	No. de catálogo	Clona	Dilución
Purificado Rata anti-ratón CD138	Rata F344, IgG _{2a} , κ	BD Biosciences Pharmingen	553712	282-12	1/300
Alexa Fluor 594 burro anti-rata IgG	IgG, policlonal	Life Technologies	A21209	No especificado	1/2000
Chivo anti-ratón IgM- FITC	IgG	Southern Biotech	1020-02	No especificado	1/1000
Fluoresceína (FITC)-AffiniPure chivo anti-ratón IgG	IgG (subclases 1, 2a, 2b, 3), policlonal	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.	115-095-164	No especificado	1/600
IgA monoclonal, Biotina	Rata IgG ₁ , κ	eBioscience	13-5994-82	11-44-2	1/1000
Estreptavidina, Alexa Fluor 488 conjugado	N/A	Life Technologies	S11223	N/A	1/2000
Purificado Rata anti-ratón IgA	Rata LOU, IgG ₁ , κ	BD Biosciences Pharmingen	556969	C10-3	1/300
Alexa Fluor 488 burro anti-rata IgG	IgG, policlonal	Invitrogen	A21208	No especificado	1/2000

ChromePure Rat IgG, molécula complete (Control de Isotipo)	Chivo IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.	012-000-003	No especificado	1/100
---	-----------	--	-------------	-----------------	-------

Figura A. Estrategia de análisis de citometría PCs de ratón

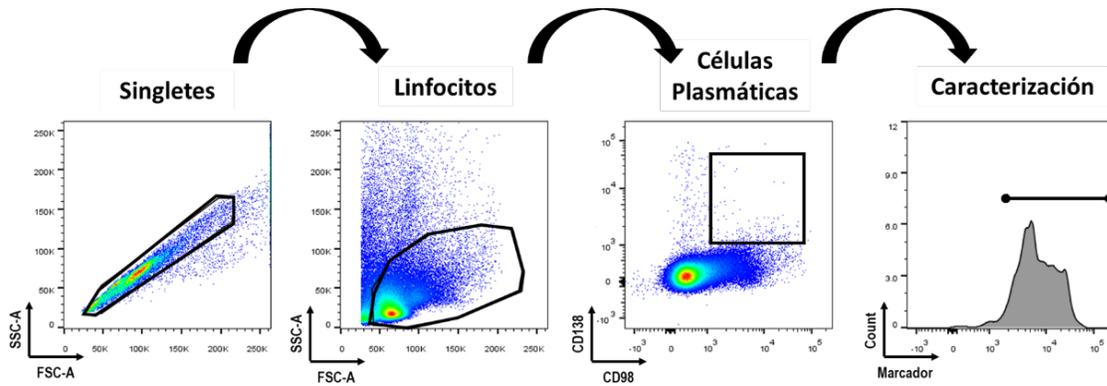
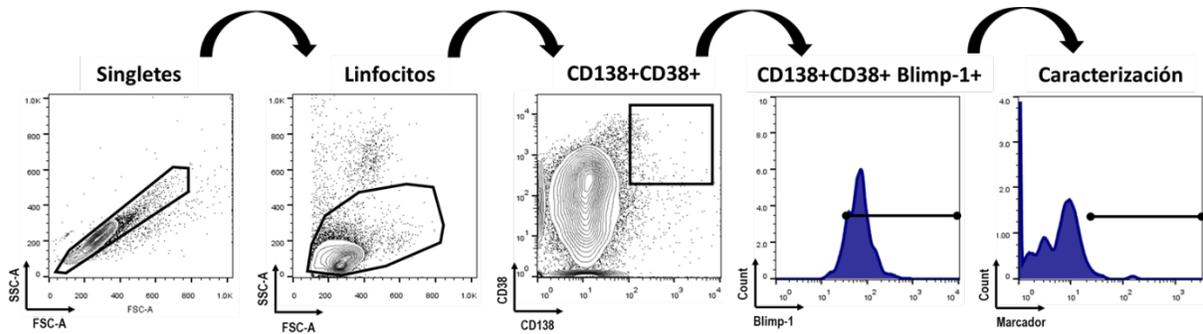


Figura B. Estrategia de análisis de citometría PCs de humano



Anexo 1. Carta de aprobación del protocolo de investigación por el Comité de Enseñanza, Investigación y Bioética del Hospital ISSEMYM de Tlalnepantla.



INSTITUTO DE SEGURIDAD SOCIAL DEL ESTADO DE MEXICO Y MUNICIPIOS.
HOSPITAL REGIONAL TLALNEPANTLA

**ACTA DE SESIÓN DEL COMITÉ DE ENSEÑANZA,
INVESTIGACIÓN Y BIOÉTICA DEL HOSPITAL,
CORRESPONDIENTE AL MES DE JULIO DE 2015.**

Reunidos en la sala de juntas del área de Enseñanza, los integrantes del Comité: revisaron el Trabajo de Investigación, que presenta como Tesis de Investigación el **M. C. Alberto Daniel Saucedo Campos**, residente de tercer grado de la especialidad de Pediatría de éste Hospital Regional de Tlalnepantla, titulado:

“GRASA VISCERAL Y SU RELACION CON MOLÉCULAS PROMOTORAS DE INFLAMACIÓN Y HORMONAS REGULADORAS, EN NIÑOS DE 6 A 12 AÑOS, CON SOBREPESO Y OBESIDAD COMO INDICADOR TEMPRANO DE DESARROLLO DE SÍNDROME METABOLICO CAPTADOS DE JUNIO 2014 A JULIO 2015 EN EL HOSPITAL REGIONAL DE TLALNEPANTLA ISSEMYM.”

Con el siguiente resultado: **SE APRUEBA PROTOCOLO PRINCIPAL E INVESTIGACIONES ANEXAS**

Se aprueba la realización del Trabajo de Tesis de Investigación presentado, ya que cumple con los principios y valores bioéticos de: beneficencia, respeto a las personas y equidad.

Siendo las 10:30 horas del día 13 de julio de 2015, se declara concluida la reunión del Comité, firmando los que participaron en la misma.

E. en C. Ped. Othón Romero Terán
Presidente del Comité de Investigación en Salud
y del Comité de Ética e Investigación en Salud

E. en NQX. Jesús Reyes Reyes.
Jefe de Educación e Investigación Médica

E. en Ped. Elizabeth Graciela Arizpe Amador
Vocal Secretario del Comité de Investigación en Salud
y del Comité de Ética e Investigación en Salud

E. en Ped. Diana Lugo Villa
Profesor Titular de la Especialidad y
Director de Tesis

Dr. en C. José Rafael Jiménez Flores
Asesor Metodológico

INSTITUTO DE SEGURIDAD SOCIAL DEL ESTADO DE MEXICO Y MUNICIPIOS



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO



"2015. Año del Bicentenario Luctuoso de José María Morelos y Pavón."

Departamento: Jefatura de la Unidad de Educación e Investigación Médica.
Oficio: CEIS/0121/T. T./15.
Expediente: POSGRADO-UAEM.
Asunto: Se envía Trabajo de Investigación de médico residente de la Especialidad de Pediatría, Sede HRT.

Tlalnepantla de Baz. Estado de México., 19 de octubre de 2015.

M. en I. C. Joaquín Roberto Beltrán Salgado.
Coordinador del Centro de Investigación y Estudios de Avanzados
en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de México
Presente:

At'n. Dr. Marco Antonio Mondragón Chimal
Jefe del Departamento de Evaluación
Profesional de la Facultad de Medicina.

Adjunto al presente, enviamos a ustedes la propuesta de investigación del servicio de pediatría presenta el **M. C. Alberto Daniel Saucedo Campos**, residente de tercer grado de la especialidad en Pediatría de este Hospital Regional de Tlalnepantla con el protocolo de Tesis: "GRASA VISCERAL Y SU RELACION CON MOLECULAS PROMOTORAS DE INFLAMACION Y HORMONAS REGULADORAS, EN NIÑOS DE 6 A 12 AÑOS CON SOBRE PESO Y OBESIDAD COMO INDICADOR TEMPRANO DE DESARROLLO DE SINDROME METABOLICO". A demás, se autoriza la colaboración con la M. en C. **Mariana del Carmen Orozco Uribe** que de manera paralela y concatenada a ejecutar por parte del CINVESTAV a cargo del tutor **Dr. Leopoldo Flores Romo** con el protocolo "CARACTERIZACION FENOTIPICA Y FUNCIONAL DE CELULAS PLASMATICAS EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL DE NEONATOS HUMANOS SANOS". Donde se realizaran los análisis de carácter básico para ambos protocolos. **NO OMITIMOS MENCIONAR** Que el único autorizado para la firma de consentimiento informrmado, recolección, conservación, resguardo y manipulación de las muestras solicitadas para ambos protocolos es el **M. C. Alberto Daniel Saucedo Campos** y por ende en caso de violar esta cláusula se revoca de manera inmediata el permiso para la ejecución de ambos protocolos, los cuales ya fueron autorizados y revisados por el comité de bioética de este hospital.

Atentamente

M. E. Jesús Reyes Reyes.
Jefe de Educación e Investigación Médica.

*Recibido
23/10/2015*

HOSPITAL REGIONAL
TLALNEPANTLA
19 OCT. 2015
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN E
INVESTIGACIÓN MÉDICA

INSTITUTO DE SEGURIDAD SOCIAL DEL ESTADO DE MÉXICO Y MUNICIPIOS

Anexo 2. Reporte de Similitud en Software Anti-plagio Turnitin



Identificación de reporte de similitud: oid:14652:242534413

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis Turnitin.docx

AUTOR

Mariana Orozco

RECUENTO DE PALABRAS

13172 Words

RECUENTO DE CARACTERES

70768 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

38 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

283.9KB

FECHA DE ENTREGA

Jun 28, 2023 11:26 AM CDT

FECHA DEL INFORME

Jun 28, 2023 11:26 AM CDT

● 5% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 3% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Cross

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)