



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“En el modelo mÚrido de Hiper IgM en el estado basal las
concentraciones de IgA fecales son significativamente mayores
que en el rat3n silvestre y esta IgA es producida en 3rganos
linfoides secundarios asociados al intestino sin centros
germinales”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Felipe de JesÚs HernÁndez CÁzares

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Guillermo Elizondo Azuela Depto. Biología Celular CINVESTAV, CDMX, México

Dra. Teresa Estrada-García Depto. Biomedicina CINVESTAV, CDMX, México

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Los órganos linfoides secundarios	11
1.1.1. El Bazo	14
1.1.2. Las placas de Peyer	15
1.1.3. El ganglio mesentérico.	16
1.1.4. Los ganglios inguinales.....	16
1.2. Linfocitos B.....	17
1.2.1. Linfocitos B1	18
1.2.2. Linfocitos B2 o Bs convencionales.....	19
1.2.3. Linfocitos B de zona marginal (BZM).....	19
1.3. El receptor de la célula B (BCR)	21
1.4. Diferenciación de los linfocitos B	22
1.4.1 Respuesta T dependiente (TD) o reacción folicular	22
1.4.2 Respuesta T Independiente (TI) o reacción extrafolicular	23
1.5. Anticuerpos o inmunoglobulinas	24
1.5.1. Inmunoglobulina M (IgM)	25
1.5.2. Inmunoglobulina D (IgD)	25
1.5.3. Inmunoglobulina G (IgG)	26
1.5.4. Inmunoglobulina A (IgA)	26
1.5.5. Inmunoglobulina E (IgE)	26
1.6. IgA en el tracto gastrointestinal	27
1.7. La Interacción CD40-CD40L.....	28
1.7.1 La molécula CD40.....	29
1.7.2 El CD40 ligando	29
1.7.3 Interacción entre CD40-CD40L.....	30
1.8. Deficiencias en la interacción CD40-CD40L.....	31
1.8.1. IgA en ratones deficientes del CD40L	32

2.	JUSTIFICACIÓN	33
3.	HIPÓTESIS.....	33
4.	OBJETIVO.....	33
4.1.	Objetivos particulares	34
5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1.	Animales.....	36
6.2.	Obtención de las muestras.....	36
6.3.	Inmunofluorescencia <i>in situ</i> del bazo, ganglio inguinal, ganglio mesentérico y placas de Peyer	37
6.3.1.	Identificación de los centros germinales (CG).....	37
6.3.2.	Identificación de células B naïve y CPs positivas para IgA	38
6.4.	Citometría de flujo	39
6.4.1.	Lavado peritoneal	39
6.4.2.	Tinciones de suspensiones celulares para citometría de flujo	39
6.5.	Lavado peritoneal, conteo celular y cytopsin	41
6.6.	Análisis estadístico	41
7.	RESULTADOS	42
7.1.	Distribución <i>in situ</i> de células IgA positivas en heces fecales de ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i> en el estado basal.....	42
7.2.	Identificación de los centros germinales en órganos linfoides secundarios de ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i> en estado basal	43
7.3.	Identificación de centros germinales en órganos linfoides secundarios de ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i> en estado basal por medio de la expresión de PNA (“Peanut agglutinin”)..	46
7.4.	Presencia de células positivas para IgD e IgA en los OLS asociados al intestino en el estado basal de ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	47
7.5.	Expresión <i>in situ e in vivo</i> de la enzima AID (activation-induced cytidine deaminase) en el ganglio mesentérico en el estado basal de ratones WT y ratones C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	50
7.6.	Distribución de los linfocitos T $\alpha\beta$ en el ganglio mesentérico en estado basal de ratones WT y ratones C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	51
7.7.	Distribución <i>in situ</i> de linfocitos T y B en las placas de Peyer de ratones WT y ratones C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	52
7.8.	Caracterización morfológica, localización microscópica y cuantificación de las poblaciones de células B y de células plasmáticas de los órganos linfoides secundarios, en el estado basal en los ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	55
7.8.1.	El bazo	55

7.8.2.	El ganglio inguinal	58
7.8.3.	El ganglio mesentérico	61
7.8.4.	Las placas de Peyer	64
7.9.	Poblaciones de LcB y CPs en suspensiones de lavados peritoneales de ratones C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i> y WT en el estado basal	68
7.10.	Evaluación del receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta (TGFB) en la superficie de los LcB totales en el estado basal de los ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	71
7.11.	Evaluación del receptor CD40 sobre la superficie de los LcB en el estado basal de los ratones WT y C57BL6- <i>cd40l^{-/-}</i>	72
8.	DISCUSIÓN.....	74
9.	CONCLUSION	81
10.	PERSPECTIVAS	82
11.	REFERENCIAS.....	83
	ARTÍCULOS	93

AGRADECIMIENTOS

A El Consejo Nacional de Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por la beca otorgada para realizar el doctorado durante el periodo del 2018-2022, CVU 780260.

Quiero agradecerle al Dr. Flores por aceptarme en su laboratorio desde el primer día por todo su apoyo, enseñanzas, momentos divertidos, el bullying, siempre será un gran ejemplo e inspiración para mí, muchas gracias Doc.

Al Dr. Guillermo Elizondo por acogerme en su laboratorio, la paciencia, su apoyo y los nuevos conocimientos que adquirí en su laboratorio.

A la Dra. Teresa Estrada por apoyarme en este proceso, recibirme en su laboratorio y por el aprendizaje obtenido en su laboratorio.

A mis asesores el Dr. Manuel Hernandez, el Dr. Jesús Martínez, el Dr. Federico Castro, por la ayuda en el ámbito personal y profesional.

Al Dr. Yam Puc por su increíble apoyo en este proceso, por ser una excelente persona, asesor y guía.

Al Dr. Santos por el apoyo en todos los aspectos, se lo agradezco mucho.

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Flores, Isis, Raúl, Mariana y Juanita que tuvimos muchas vivencias juntos a lo largo de los años.

A mis compañeros de mis nuevos laboratorios Fer, David, Ángel, Danny y Fátima por ser comprensivos conmigo, apoyarme en cualquier cosa que necesitara y los buenos ratos.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Santos Lenin, Mizael, Diana, Leo, Iván, Obed por el apoyo en los experimentos, las risas los buenos momentos y sobre todo por ese gran apoyo moral.

A Yola, Grecia y la Sr. Mago por su gran disposición y su ayuda en el laboratorio.

A mis amigos Irving, Elena, Arely, Noe, Hugo, Fer, Marcos, Reno, Mafer, Carla y Ari por el cariño en estos años que fueron sumamente importantes.

A mis papas Febe y Fidel por siempre apoyarme en todos los aspectos tanto personales como laborales y ser un gran ejemplo de trabajo y esfuerzo.

A Caro por todo el apoyo en estos años, el cariño, las risas, las películas, los paseos jaja y mucho más, so much love para ti 😊.

RESUMEN

Introducción: Los pacientes con el síndrome de Hiper IgM (HIGM) presentan infecciones pulmonares y gastrointestinales recurrentes desde la infancia. Los pacientes con HIGM, comparados con los sujetos sanos, se caracterizan por tener concentraciones séricas más altas o similares de IgM y más bajas de IgG e IgA, pero hasta el momento se desconocen las concentraciones de estos anticuerpos intestinales en estos sujetos. La mayoría de estos pacientes presentan mutaciones en el gen del ligando de CD40 (CD40L), esta molécula se expresa en la superficie de las células T activadas, que interactúa con CD40 presente en la superficie de las células B. La interacción CD40L-CD40 es primordial en la formación de centros germinales (GC) dentro de los órganos linfoides secundarios (OLS), donde se generan los anticuerpos de alta afinidad, las células plasmáticas (CP) secretoras de anticuerpos de larga vida y las células B de memoria. Los ratones C57BL/6 deficientes del ligando de CD40 (C57BL6-*cd40l*^{-/-}), son un modelo para el estudio del síndrome de HIGM, ya que sus concentraciones séricas de inmunoglobulinas son similares a las descritas en los pacientes con HIGM y tienen concentraciones de IgA fecal significativamente más altas que las de los ratones silvestres. La producción de IgA es dependiente de la presencia de citocinas como TGFβ e IL-5 en el microambiente.

Objetivos: Comparar y evaluar ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y C57BL6 silvestres (WT) en estado basal, las poblaciones de células B y de CP productoras de IgA en lavados peritoneales, en los OLS no asociados con el intestino (ganglios linfáticos inguinales (ILN), bazo) y en los OLS asociados con el intestino (ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y placas de Peyer (PP)).

Material y métodos: Se obtuvieron, los bazos, ILN, MLN, PP y lavados peritoneales de ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT de 8-10 semanas de edad. Se realizaron crio secciones de los órganos de interés y se analizaron mediante inmunofluorescencia. Las poblaciones de células B y las CP IgA-positivas se determinaron a partir de suspensiones celulares de los órganos y los lavados peritoneales mediante citometría de flujo.

Resultados: En el estado basal, en los ratones WT se observaron CG en los OLS asociados al intestino, pero no en los OLS no asociados al intestino. Bajo las mismas condiciones, no se observaron CG en ninguno de los OLS de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Las PP y los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} tuvieron un número significativamente mayor de CP IgA-positivas que los ratones WT. En el bazo y en el ILN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, las CP IgA-positivas disminuyeron significativamente, mientras que las CP IgM-positivas incrementaron. En todos los OLS analizados de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} las células B1 fueron significativamente más abundantes, que en los ratones WT, en donde la mayoría de las células B1 se localizaron dentro de la cavidad peritoneal. Las células B en los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} expresaron una mayor cantidad del receptor-1 de TGFβ (TGFβR1) que en las células B de los ratones WT. Ambas cepas de ratón tienen una frecuencia similar de células IgA-positivas en las microvellosidades (MV) del intestino delgado. **Discusión:** Nuestros resultados confirman que el intestino en condiciones basales esta permanente expuesto al reto antigénico como lo muestra la presencia de GC en los OLS intestinales de los ratones WT. El modelo murino de HIGM confirma que las PP y el MLN, incluso en la ausencia de CG, son sitios anatómicos de inducción de IgA intestinal en donde también se observa un incremento de la expresión TGFβR1 en las células B, mostrando un ambiente polarizado hacia una repuesta de IgA.

SUMMARY

Introduction: Patients with Human Hyper IgM syndromes (HIGM) developed pulmonary and gastrointestinal infections since infancy and most patients have mutations in the CD40 ligand (CD40L) gene. Most HIGM patients compared to healthy subjects have higher/similar IgM and lower IgG, and IgA serum concentrations but gut antibody concentrations are unknown. CD40L on activated T-cells interacts with CD40 on B-cells, essential for the formation of germinal centres (GCs) inside secondary lymphoid organs (SLOs), where high-affinity antibodies, long-lived antibody-secreting plasma cells, and memory B-cells, are produced. C57BL6-CD40 ligand deficient mice (C57BL6-*cd40l*^{-/-}), are a model of HIGM, because serum immunoglobulin concentrations parallel levels observed in HIGM patients and have higher faecal IgA concentrations. In mice, TGFβ and IL-5 induce IgA production.

Aims: To compare and evaluate B-cell populations and IgA-producing plasma cells in peritoneal lavage, non-gut-associated SLOs, spleen/inguinal lymph nodes (ILN), and gut-associated SLOs, mesenteric lymph nodes (MLN)/Peyer's patches (PP) of unimmunised C57BL6-*cd40l*^{-/-} and C57BL6-wild-type (WT) mice.

Material and methods: Peritoneal lavages, spleens, ILN, MLN, and PP from 8-10 weeks old C57BL6-*cd40l*^{-/-} and WT mice, were obtained. Organ cryosections were analysed by immunofluorescence and B-cell populations and IgA-positive plasma cell suspensions by flow cytometry.

Results: In unimmunised WT mice, GCs were only observed in the gut-associated SLOs, but GCs were absent in all C57BL6-*cd40l*^{-/-} SLOs. PP and MLN of C57BL6-*cd40l*^{-/-} mice exhibited a significantly higher number of IgA-producing cells than WT mice. In the spleen and ILN of C57BL6-*cd40l*^{-/-} mice IgA-producing cells significantly decreased, while IgM-positive plasma cells increased. C57BL6-*cd40l*^{-/-} B1 cells were more abundant in all analysed SLOs, whereas in WT mice most B1 cells were contained within the peritoneal cavity. C57BL6-*cd40l*^{-/-} B-cells in MLN expressed a higher TGFβ receptor-1 than WT mice. Mouse strains small intestine microvilli (MV), have a similar frequency of IgA-positive cells.

Discussion: Together our results confirm the role of PP and MLN as gut inductive sites, whose characteristic features are to initiate an IgA preferential immune response production in these anatomical sites even in the absence of GCs. IgA antibodies play a pivotal role in neutralising, eliminating, and regulating potential pathogens and microorganisms in the gut.

ABREVIATURAS

(PPS)-3 = polisacárido capsular neumocócico serotipo 3.

°C = grados centígrados.

a.a. = aminoácidos.

AID = citidina desaminasa inducida por activación.

APC = alofocianina.

APRIL = Ligando inductor de proliferación.

BAFF = factor de activación de las células B.

BCR = receptor de célula B.

BSA = Solución de albúmina sérica bovina.

BZ = zona de linfocitos B.

CD = cluster de diferenciación.

CD40L = CD40 ligando.

CDRs = región determinante de la complementariedad.

CG = centro germinal.

CICUAL = Comité Interno Para El Cuidado Y Uso De Los Animales De Laboratorio.

Citrobacter rodentium = *C. rodentium*.

CP = célula plasmática.

CSR = cambio de clase.

CXCL13= Ligando de quimiocina 13.

CXCR5= receptor de quimiocina tipo 5.

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

DZ = zona oscura.

Escherichia coli = *E. coli*.

EZ = zona extrafolicular.

Fab = fragmento de unión al antígeno.

FAE = Epitelio Asociado al Folículo.

Fc = Fragmento cristalizable/fragmento constante.

FDCs = Células dendríticas foliculares.

FITC = "Fluorescein isothiocyanate"

GALT = tejido linfoide asociado al intestino.

HEV = Vénulas endoteliales altas.

HIGM = síndrome de hiper-IgM.

IFN = interferón.

Ig = Inmunoglobulina.

IgA = Inmunoglobulina A.

IgD = Inmunoglobulina D.

IgE = Inmunoglobulina E.

IgG = Inmunoglobulina G.

IgM = Inmunoglobulina M.

IL = Interleucina.

ILF = Folículos Linfoides Aislados.

ILN = Ganglio Inguinal.

Jak3 = "Janus kinases 3".

KDa = Kilo dáltones.

L=lumen.

Lc = Linfocito.

LcB = Linfocito B o célula B.

LcBZM = Linfocitos B de zona marginal

LcT = Linfocito T o célula T.

LPS = lipopolisacárido.

LZ = zona clara.

MFI = Intensidad media de fluorescencia.

MHC-II = complejo principal de histocompatibilidad tipo II.

Min = minutos.

mL = mililitros.

MLN = ganglio linfático mesentérico.

MV= microvilli= microvellosidades.

NF-kB = Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NHEJ = Sistema de reparación no homóloga.

NKs = "Natural killers".

OLS = Órganos linfoides secundarios.

PBS = "Phosphate-buffered saline".

PNA = aglutinina de cacahuete.

PP = placas de Peyer.

Ratones C57/BL6 silvestres = ratones WT.

Ratones C57/BL6-*cd40l*^{-/-} = Ratones C57/BL6 deficientes para el ligando de CD40.

Recombinación V(D)J = V=variable, D= diversidad y J=unión.

SED = Domo subepitelial.

SEM = error estándar de la media.

SHM = Hiper mutación somática.

SI = Sistema inmune.

STAT = Transductor de señal y activador de la transcripción.

Streptococcus pneumoniae = *S. pneumoniae*.

TCR = receptor de célula T.

TD = reacción T dependiente.

TdT = Desoxinucleotidil transferasa terminal.

TGFβ = factor de crecimiento transformante β.

TGFβR1 = receptor 1 del factor de crecimiento transformante β.

TI = reacción T independiente.

TLRs = receptors Toll-like.

TNF = "Tumor Necrosis Factor".

TRAF = Factores asociados al receptor de TNF.

TZ = zonda de linfocitos T.

UPEAL = Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio.

μm = micrómetro.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los órganos linfoides secundarios

Los órganos linfoides secundarios (OLS) son estructuras en forma capsular y ovoide, compuestos por tejido fibrovascular y linfoide (principalmente linfocitos B y T). Los OLS se desarrollan durante la etapa embrionaria, los cuales se encuentran distribuidos estratégicamente en el organismo para realizar sus funciones (Buettner M y Bode U, 2012).

La arquitectura y la distribución celular de los OLS son muy importantes para realizar sus funciones, las cuales se caracterizan por la presencia de compartimentos específicos que facilitan la llegada y la salida de células del sistema inmune (SI), principalmente los linfocitos, así como las interacciones celulares y la presentación de los antígenos a los linfocitos (Lc). Se ha visto que las alteraciones en la arquitectura de los OLS afectan gravemente las respuestas inmunes. Dichas alteraciones pueden deberse entre otras a enfermedades parasitarias, inflamación crónica, daño del tejido y edad avanzada, (Bernier-Latmani J y Petrova TV, 2017).

El soporte de los OLS es una estructura compuesta por una malla de células endoteliales, reticulares y conectivas. Además, los OLS contienen compartimentos constituidos por una red reticular que alberga principalmente células linfoides. La estructura y el soporte de dichos órganos es plástica, ya que hay un flujo constante de entrada y salida de células, procesos de proliferación y muerte celular. Para la circulación de las células en los OLS, éstos poseen una red de vasos sanguíneos y linfáticos por donde éstas migran durante los procesos biológicos como la inflamación, el reclutamiento celular, la presentación antigénica, etc. (Ager A, 2017).

La principal función de los OLS es facilitar el encuentro entre el antígeno y sus linfocitos (B o T), donde la organización y la distribución celular juegan un papel importante. Los OLS se encuentran conectados entre sí mediante una red de vasos sanguíneos, linfáticos aferentes y eferentes. Por los conductos aferentes circulan las células del SI, principalmente los linfocitos y los antígenos. Los conductos aferentes están ramificados en la zona adyacente al folículo, incrementando la probabilidad del encuentro entre los linfocitos y los antígenos. Mientras que por los conductos eferentes salen mayoritariamente los linfocitos. (Willard-Mack CL., 2006).

Cuando los linfocitos en el OLS no encuentran a su antígeno salen por los conductos eferentes y migran a otro OLS en búsqueda de su antígeno. El tiempo en el que los linfocitos permanecen en un OLS y los mecanismos de migración a otros OLS no está del todo claro. (Cyster JG y Allen CDC., 2019).

Generalmente los OLS, con base en el tipo de linfocitos que contengan, se dividen en dos zonas: el folículo en el cual contiene a los LcB y la médula o zona extra folicular donde contiene a los LcT (Figura 1). El reclutamiento de ambos tipos de linfocitos a sus zonas respectivas es de suma importancia para inducir respuestas inmunes óptimas. A través de su receptor CXCR5, los LcB son reclutados al folículo, en donde se mantiene un gradiente elevado de su ligando la citocina CXCL13. Dicho gradiente mantiene una movilidad constante de los LcB. En particular CXCL13 es producida tanto por las células dendríticas foliculares (FDCs) como por las células estromales presentes en el folículo. Además, dentro del folículo, los LcB reciben señales de supervivencia como la citocina BAFF (factor de activación de las células B) expresada por las células estromales. Cabe mencionar que en general el reclutamiento de las células inmunes al OLS no es constante y depende directamente de los antígenos.

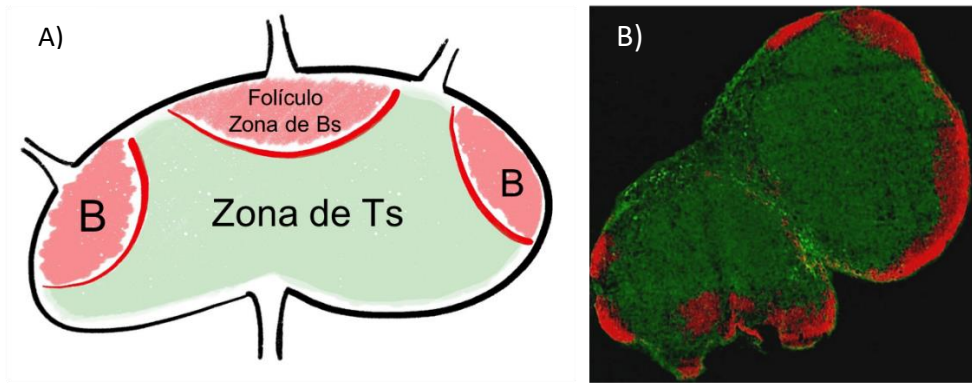


Figura 1. Zonas generales de un ganglio linfático. A) Esquema de un ganglio linfático. En color rojo se indica la zona folicular, también conocida como zona de LcB. En color verde se indica la zona de LcT o zona extra folicular. B) Fotografía de una tinción de inmunofluorescencia de un ganglio Inguinal (ILN) de un ratón C57BL/6, procesada en nuestro laboratorio, donde en color rojo están marcadas las células B (B220), revelando la zona folicular. En color verde se observan a los LcT (CD4), mostrando la zona extra folicular.

Los OLS incluyen al bazo, a los ganglios linfáticos, las placas de Peyer y a los folículos linfoides aislados. En estos OLS se lleva a cabo una de las respuestas inmunes más importantes que es la producción de los anticuerpos, estos son producidos por las células plasmáticas las cuales provienen de linfocitos B activados por su antígeno. (Van den Broeck W, et al., 2006).

1.1.1. El Bazo

Es el principal órgano filtrador de sangre y el OLS de mayor tamaño del organismo. Posee una gran cantidad de arterias que se ramifican a través de todo el órgano; está dividido en 3 zonas: la pulpa blanca, la pulpa roja y la zona marginal (Figura 2).

La pulpa blanca está compuesta principalmente por linfocitos, que están en los folículos (LcB) y la zona de LcT; rodeando a la pulpa blanca se encuentra una población de macrófagos altamente especializados, conocida como zona marginal, que al activarse fagocitan a una gran cantidad de antígenos y alrededor de la zona marginal se encuentra la pulpa roja, donde se filtra la mayoría de la sangre y donde se retira a los eritrocitos viejos. En el suero es donde principalmente se detectan a los anticuerpos producidos por los OLS (Mebius RE y Kraal G., 2005).

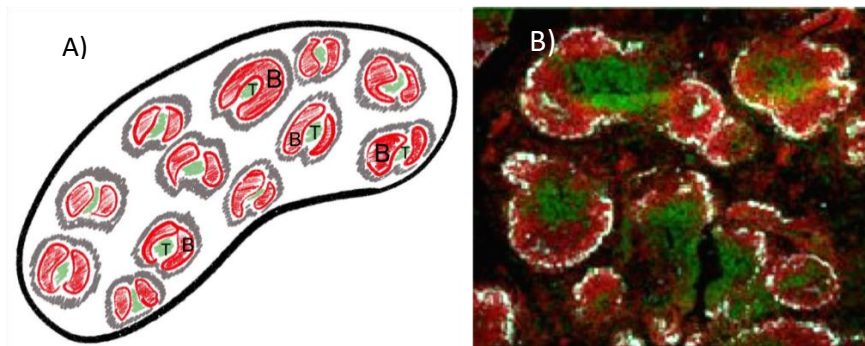


Figura 2. Regiones del bazo. (A) se muestra un esquema del bazo. En color rojo se marca la zona folicular, en color verde la zona de LcT (pulpa blanca) y en gris la zona marginal. (B) Corte histológico de un bazo de ratón C57BL/6 con una tinción de inmunofluorescencia donde en color rojo se marca a los LcB (B220), indicando la zona folicular. En verde se observa la expresión de los LcT (CD4), mostrando la zona de T y en blanco se muestra la zona marginal.

1.1.2. Las placas de Peyer

Las placas de Peyer (PP) son OLS que se localizan en el intestino. Morfológicamente se separan en 3 compartimientos: el folículo, el área interfolicular que está constituido por células T y una mono capa epitelial externa conocida como FAE (por sus siglas del inglés de “follicle-associated epithelium”). El folículo está constituido principalmente por LcB, y es el sitio anatómico donde se induce la formación de los centros germinales (CG) como en los folículos de otros OLS. Esta zona folicular está rodeada por el SED (por sus siglas del inglés de “subepithelial dome”) que consiste en una población heterogénea de células B, T, células dendríticas (DCs) y macrófagos. Adyacente al SED se localiza el FAE el cual es una mono capa epitelial (enterocitos) donde se localizan las células M. Este epitelio está recubierto por una capa delgada de moco, en contraste con otras regiones del intestino. Las células M son enterocitos especializados en realizar transcitosis de antígenos, proteínas y especialmente de IgA, la cual puede estar unida a algún antígeno (Figura 3). Las PP están conectadas con el ganglio mesentérico y otros OLS mediante vasos sanguíneos (HEV) y vasos linfáticos. En el intestino la mayor cantidad de IgA proviene de la PP (Jung C, et al., 2010).

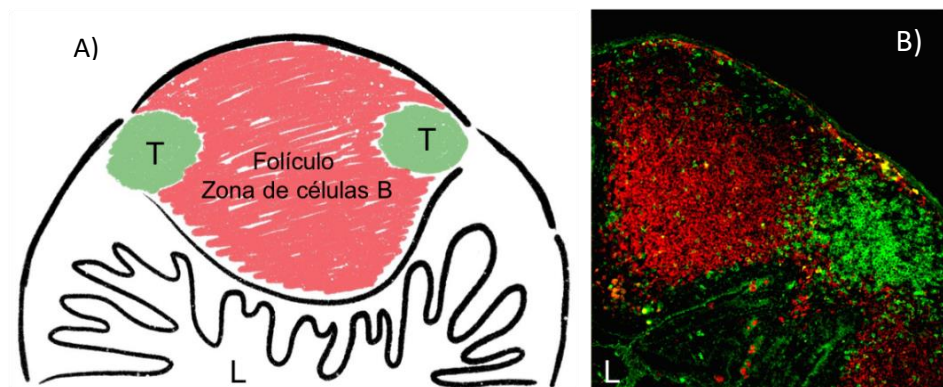


Figura 3. Regiones de la placa de Peyer. (A) Esquema de una placa de Peyer. En color rojo se marca la zona folicular, en verde la zona de células T y la luz intestinal se indica con la letra “L”. (B) corte histológico de una PP de ratón C57BL/6 con una tinción de inmunofluorescencia donde en color rojo se marca B220 (marcando a las células B)

indicando la zona folicular. En verde se ve la expresión de CD4, mostrando la zona de linfocitos. La letra “L” indica la luz intestinal.

1.1.3. El ganglio mesentérico.

El ganglio mesentérico (MLN por sus siglas en inglés de “Mesenteric Lymph Node”) comparte la estructura general de otros OLS, pero a diferencia de estos, el reclutamiento de las células inmunes presentes en el tracto gastrointestinal se lleva a cabo de manera constante en el estado basal. Esto resulta en la activación de los linfocitos. En el MLN se dan constantemente respuestas inmunes de tolerancia, donde el SI reconoce a los antígenos sin que ésta llegue a provocar respuesta inflamatoria. Por lo que el MLN además de ser un sitio de inducción de la respuesta inmune también es un sitio inductor de tolerancia hacia los antígenos de la comida o de la microbiota y además funciona como una barrera protectora hacia los antígenos de patógenos, ya que puede evitar su diseminación (Pabst O, et al., 2009). Una gran cantidad de los anticuerpos antígeno específico presente en la lámina propia proviene de los MLN, siendo un OLS de suma importancia para las respuestas inmunes del tracto gastrointestinal (Buettner M y Bode U, 2012). Es relevante remarcar que el MLN filtra tanto la linfa como la sangre de amplias secciones del tracto gastrointestinal (Pabst O, et al., 2009).

1.1.4. Los ganglios inguinales.

Los ganglios inguinales (ILN “Inguinal Lymph Nodes”) son OLS ubicados en la ingle (en ratones uno de cada lado) y drenan la piel cercana al órgano, las extremidades inferiores y los órganos reproductores, estos OLS no están asociados con el tracto gastrointestinal. Poseen una arquitectura y distribución celular similar a otros OLS presentando una zona de LcB y zona de LcT bien delimitada (Van den Broeck W, et al., 2006; Willard-Mack CL, 2006)

1.2. Linfocitos B

Los linfocitos B (LcB) o las células B se caracterizan por su receptor el BCR (por sus siglas en inglés de “B cell Receptor”), el cual reconoce a un antígeno específico, induciendo la activación del linfocito B, hacia su diferenciación a una célula plasmática (CP) productora y secretora de anticuerpos, o hacia una célula B de memoria. En los diferentes estadios de diferenciación del LcB el BCR o el anticuerpo (el BCR secretado) siempre reconoce al mismo antígeno que provocó la activación del linfocito B. (Pieper K, et al., 2013).

Hay tres tipos de LcB: LcB1, LcB convencionales o B2, y LcB de zona marginal (LcBZM). Los cuales se diferencian entre sí por: su ontogenia, su localización, la expresión de citocinas, el umbral de activación de su BCR y por otros receptores de activación (como los TLRs). (Figura 4) (Chi X, et al., 2020). Las diferentes moléculas con los que se caracteriza a los diferentes tipos de LcB se muestran en la tabla 1.

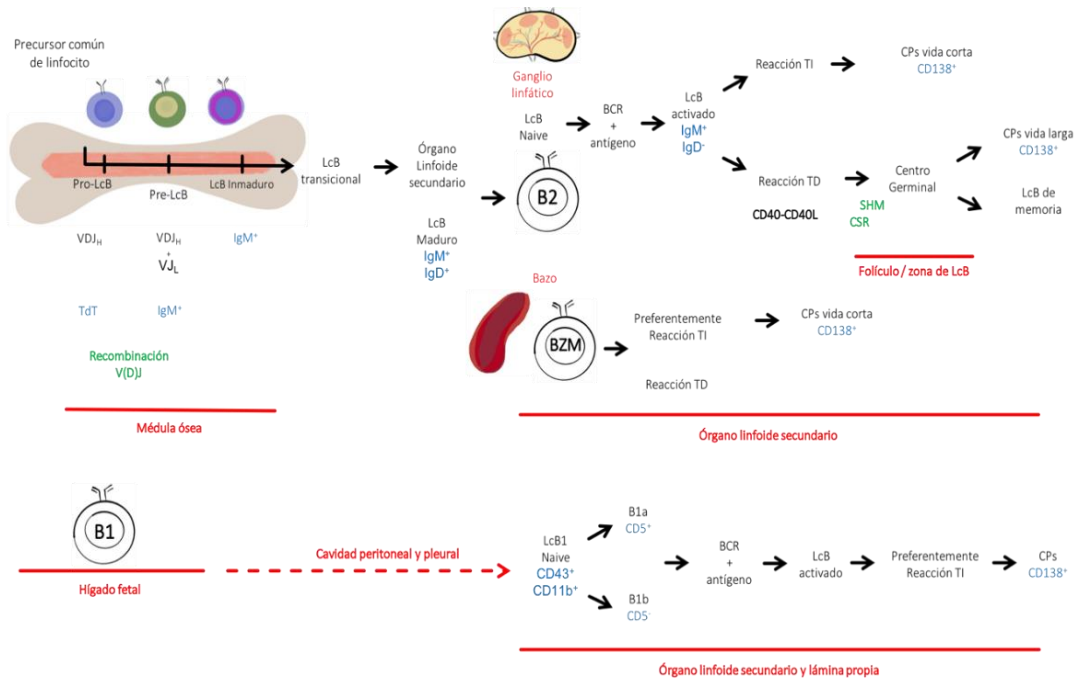


Figura 4. Ontogenia de los linfocitos B. Se muestra la ontogenia (izquierda) y la diferenciación de los LcB. Las líneas y letras rojas indican la localización donde ocurre el proceso. Las letras verdes indican el momento donde ocurren los cambios genéticos del BCR. Las letras azules denotan las moléculas características de las poblaciones celulares. Lc=linfocito. TD= reacción T dependiente. TI= reacción T independiente. SHM= "Somatic Hyper Mutation". CSR= "Class Switch Recombination". LcB =Linfocitos B. CPs= Células plasmáticas.

1.2.1. Linfocitos B1

Es una población de células B que se localiza principalmente en la cavidad peritoneal, pleural y con frecuencia muy baja en el bazo.

Estos linfocitos son abundantes durante el desarrollo fetal, inician su ontogenia en una etapa más temprana que los LcB2. Principalmente, expresan anticuerpos IgM e IgA. A diferencia de lo LcB2, el umbral de activación del BCR de los LcB1 parece ser menor y generalmente se diferencian a través de reacciones T independientes (TI). Los anticuerpos producidos por las células plasmáticas (CP) provenientes de LcB1 son mayoritariamente anticuerpos poli-reactivos, que reconocen con baja afinidad a los antígenos, los cuales principalmente provienen de la microbiota y antígenos propios. (Reap EA, et al., 1993).

Los LcB1 de ratón se dividen a su vez en dos subpoblaciones: LcB1a que expresan la molécula CD5 en superficie y los LcB1b que no la expresan. Se desconoce la función de dicha molécula; sin embargo, se sugiere que CD5 funciona como un regulador negativo del BCR. (Prieto JMB y Felipe MJB, 2017; Baumgarth N, 2011).

1.2.2. Linfocitos B2 o Bs convencionales

Son los LcB más abundantes del organismo, están albergados principalmente en los OLS, son producidos en la médula ósea en las etapas finales del desarrollo fetal y durante la etapa adulta, y migran constantemente de un OLS a otro en busca de su antígeno.

Los LcB2 con frecuencia cooperan con los LcT, que junto con el estímulo del antígeno y del microambiente se activan y su BCR puede llevar a cabo un cambio de isotipo, diferenciarse y expresar un tipo diferente de inmunoglobulina de superficie (IgM, IgG, IgA e IgE) e incrementan la afinidad por su antígeno. Como resultado de la cooperación con los LcT, los LcB2 pueden entrar en una reacción de CG, donde ocurren cambios en los genes que codifican al BCR (SHM), los cuales influyen en la maduración de la afinidad por su antígeno (Cyster JG y Allen CDC, 2019).

1.2.3. Linfocitos B de zona marginal (BZM)

Estas células se localizan exclusivamente en la zona marginal del bazo (situada entre la pulpa blanca y la pulpa roja). En esta zona hay una entrada abundante y constante de sangre, lo que permite a los LcBZM interactuar con una gran cantidad de antígenos (D'Souza L y Bhattacharya D., 2019). A diferencia de los LcB2, esta población linfocitaria no recircula a través de diferentes OLS, sino que permanece en el bazo, son células grandes, poseen un BCR poli-reactivo y se diferencian preferentemente a CPs a través de reacciones TI. Las CPs provenientes de LcBZM producen anticuerpos de baja afinidad que reconocen antígenos: propios, de restos celulares y antígenos abundantes en la sangre. Esta población de linfocitos se activa con facilidad por el reconocimiento de antígenos por medio de los TLRs (Palm AE y Kleinau S, 2021).

	B2	B1		B zona marginal
Subpoblaciones	-	B1a	B-1b	-
fenotipo	CD5 ⁻	CD5 ⁺	CD5 ⁻	CD5 ⁻
	CD19 ⁺	CD19 ⁺	CD19 ⁺	CD19 ⁺
	CD23 ⁺	CD23 ⁻	CD23 ⁻	CD23 ⁻
	CD43 ⁻	CD43 ⁺	CD43 ⁺	CD43 ⁻
	CD11b ⁻	CD11b ⁺	CD11b ⁺	CD11b ⁻
	IgM ^{low}	IgM ^{hi}	IgM ^{hi}	IgM ^{hi}
	IgD ^{hi}	IgD ^{low}	IgD ^{low}	IgD ^{low}
	CD45R ⁺	CD45R ⁺	CD45R ⁺	CD45R ⁺
Expresión de TdT	+++	-/+?	-/+?	+
Localización	OLS	Cavidad pleural y peritoneal		Bazo
Ontogenia	Médula ósea	Hígado fetal		Médula ósea

Tabla 1. Características que diferencian a las células B1, B2 y B de zona marginal (Meyer-Bahlburg A, 2015; Prieto JMB y Felipe MJB, 2017; Savage HP y Baumgarth N, 2015).

1.3. El receptor de la célula B (BCR)

El receptor característico de la célula B es el BCR, el cual se une a un antígeno específico, por lo tanto, cada BCR es diferente entre sí, al ser secretado por una CP se le conoce comúnmente como anticuerpo o inmunoglobulina de superficie (Feng Y, et al., 2020).

Este receptor está constituido de cuatro subunidades: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas con una porción transmembranal. Las cuatro subunidades interactúan con el antígeno, la región que hace contacto directo con el antígeno se denomina Fab (“fragment antigen binding”), mientras que la región del receptor que no entra en contacto directo con el antígeno se conoce como Fc (“fragment crystallizable”) (Treanor B, 2012).

Durante la ontogenia del LcB (Pre-B y Pro-B) en la médula ósea, el BCR tiene un papel fundamental en la supervivencia de las células B. En este órgano, se lleva a cabo un proceso de selección donde los ligandos expresados por células estromales son reconocidos por el BCR, lo que resulta en señales de supervivencia y de selección de los linfocitos B funcionales permitiendo su maduración. En una célula B madura, el BCR al unirse a su antígeno, iniciará una cascada de señalización que finalizará con una respuesta tolerogénica, donde el BCR se une a su antígeno activando al LcB y provocando una respuesta inmune pasiva hacia este antígeno. Por otro lado, puede haber en una respuesta inmune de diferenciación hacia una célula B de memoria o hacia una CP (Graf R, et al., 2019).

Existen varios factores determinantes para la activación del BCR, entre otros: la duración de la interacción entre el BCR y el antígeno, la fuerza de la señalización determinada por la cantidad de antígeno presente y el tamaño del antígeno. Además, para la respuesta del LcB y su diferenciación se requieren otras señales celulares como los estímulos derivados por contacto celular o por factores solubles, que son de gran importancia. La señal del BCR se puede modificar y amplificar por la unión de los antígenos a otros receptores como los TLRs, los receptores del complemento y los receptores de citocinas.

De tal manera que el BCR determinará el destino del LcB, es decir su activación, sobrevivencia y muerte celular en sus etapas inmaduras y maduras, así como su diferenciación a células productoras de anticuerpos o a células B de memoria (Tolar P y Pierce SK, 2022).

En una reacción TD, después de que el BCR reconoce a su antígeno, se internaliza en el LcB. Los antígenos viajarán en endosomas hacia los lisosomas donde son procesados y cargados en la molécula MHC-II a través de la cual el LcB presenta el antígeno procesado al LcT cooperador (Matsuuchi L y Gold MR, 2001).

1.4. Diferenciación de los linfocitos B

La diferenciación de los linfocitos B se puede dar a través de 2 tipos de reacción: T dependiente o T independiente (Elsner RA y Shlomchik MJ, 2020).

1.4.1 Respuesta T dependiente (TD) o reacción folicular

Los LcB, al reconocer a su antígeno, lo internalizan, lo procesan y lo presentan a los LcT cooperadores (CD4⁺). En consecuencia, se producen diversas interacciones: entre el BCR-antígeno-MHC-II, entre las moléculas de adhesión que participan en la interacción, y entre las moléculas de co-estimulación como CD40-CD40L. Estas interacciones son las que inducen la formación del CG dentro del folículo en los OLS (Mesin L, et al., 2016).

En el CG hay una reorganización de los tejidos linfoides, así como una comunicación celular dinámica. El CG se divide en dos zonas: la zona oscura o DZ (por sus siglas en inglés de “Dark Zone”) y la zona clara o LZ (por sus siglas en inglés de “Light Zone”). En la DZ ocurre una alta proliferación de LcB así como la SHM, evento que incrementa la afinidad del BCR por su antígeno mediante re-arreglos puntuales de su BCR en la sección variable (CDRs) (Figura 5 B) (Methot SP y Di Noia JM, 2017). Al incrementar su afinidad los LcB pasan a la LZ. En la LZ aquellos LcB que posean una mayor afinidad por su antígeno son seleccionados positivamente a través de señales de sobrevivencia provenientes de las FDCs. Una vez seleccionados positivamente los LcB salen del folículo, se

comprometen y diferencian en CPs o en LcB de memoria, los cuales pueden colonizar tejidos específicos como la médula ósea y la lámina propia (Figura 5 A) (Methot SP y Di Noia JM, 2017). Los LcB que no son seleccionados positivamente pueden regresar a la DZ donde pueden morir por apoptosis o experimentar la SHM para poder ser seleccionados (Barnett BE, et al., 2012; Zuo T, et al., 2019).

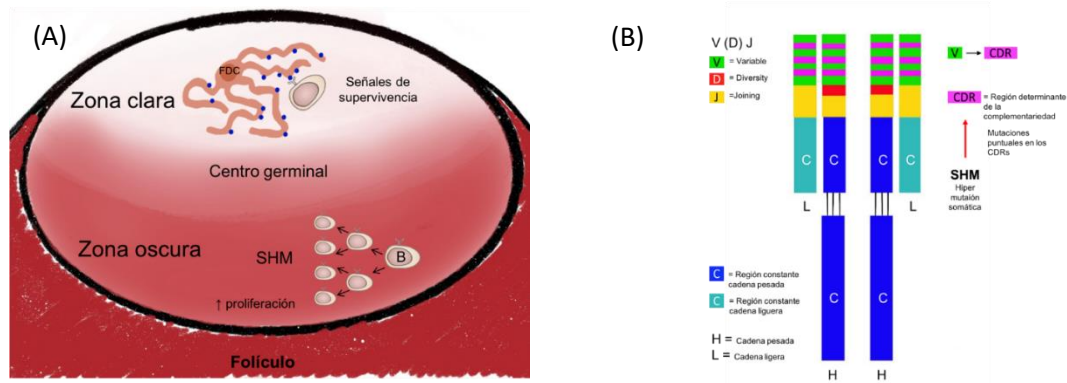


Figura 5. (A) Centro germinal y (B) la hipermutación somática. La SHM ocurre en la sección variable (V en verde) del receptor y es la región que entra en contacto directo con el antígeno (Fab), mientras que las regiones constantes de la cadena pesada constituyen el Fc del anticuerpo (C, en azul oscuro).

1.4.2 Respuesta T Independiente (TI) o reacción extrafolicular

Algunos antígenos inducen la diferenciación de LcB sin la necesidad de las señales de cooperación provenientes de los linfocitos T. Este proceso de diferenciación ocurre dentro de los OLS, pero fuera de la zona folicular. En esta reacción TI la activación de los LcB al reconocer a su antígeno es a través de los receptores como el BCR o los TLRs (Figura 6), además, los receptores para diversas citocinas facilitan la activación de los LcB y su polarización hacia la producción de ciertas inmunoglobulinas. La reacción extrafolicular o TI es más rápida que la respuesta TD, puesto que no se lleva a cabo la SHM, lo que resulta en una producción de anticuerpos con una menor afinidad a su antígeno. Cabe

mencionar que los tres tipos de LcB tienen la capacidad de realizar reacciones extrafoliculares (MacLennan IC, et al., 2003).

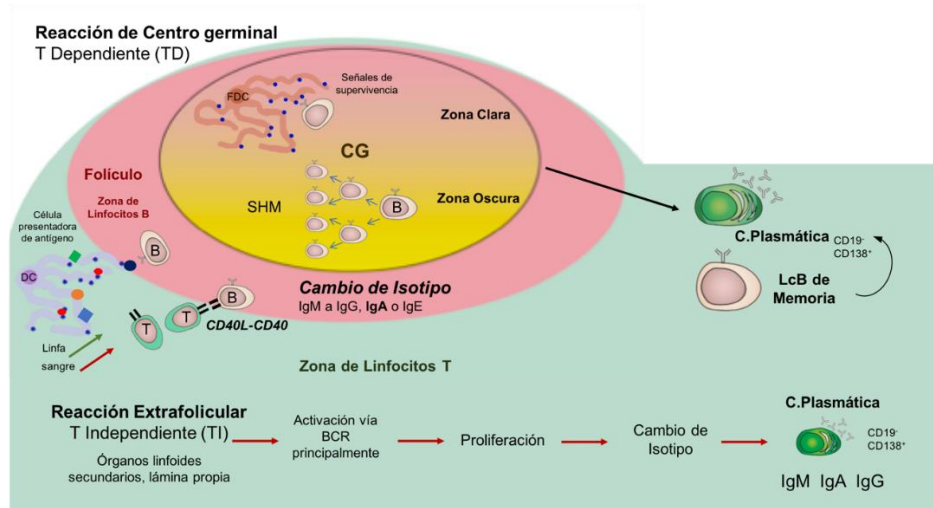


Figura 6. Reacciones de diferenciación de células B, T dependientes y T independientes. En este esquema el folículo se muestra en color rojo, la zona de linfocitos T está en color verde y en color amarillo, está representado el centro germinal (CG).

1.5. Anticuerpos o inmunoglobulinas

Los LcB tienen al receptor BCR anclado en la membrana, el cuál es una inmunoglobulina (Ig). Una vez que el BCR reconoce a su antígeno el LcB puede diferenciarse a CP y produce anticuerpos contra el antígeno (Schroeder HW Jr y Cavacini L, 2010). La región del anticuerpo que reconoce y entra en contacto con el antígeno es llamada paratope, mientras que el sitio del antígeno que es reconocido y ligado por el anticuerpo es el epítotope. Estos sitios de contacto son altamente específicos. Sin embargo, hay epítotope que son muy parecidos unos con otros y en ocasiones la Ig reconoce a más de un epítotope, a esto se le conoce como reacción cruzada. Normalmente, las Igs reconocen a un solo

antígeno, pero existen anticuerpos poli-reactivos que reconocen a un mayor número de antígenos.

La presencia de los antígenos determina la producción, la cantidad y la localización de los anticuerpos. La respuesta a los antígenos por organismo puede desencadenar funciones tan importantes como la formación del CG, la SHM de los anticuerpos, el cambio de clase del anticuerpo (CSR por sus siglas en inglés “Class Switch Recombination”), la generación de células B de memoria y de CPs.

Existen 5 isotipos de Igs: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. El isotipo está determinado por la región constante (Fc) del anticuerpo que es diferente entre los diferentes isotipos. El Fc desencadena respuestas celulares al unirse a los receptores de células efectoras o a otros factores del SI, como es el caso del complemento; por lo tanto, el isotipo de una Ig es determinante en las respuestas inmunes.

1.5.1. Inmunoglobulina M (IgM)

En la ontogenia de los LcB la IgM es la primera Ig que se expresa, ésta se asocia a respuestas inmunes primarias y en su forma soluble, puede estar presente en forma monomérica o pentamérica unida por medio de la cadena J a través de sus regiones Fc. La IgM tiene una vida media de 10 días, comparada con las IgG e IgA tiene una baja afinidad por los antígenos, pero una alta avidéz, tiende a ser una Ig poli-reactiva lo que le permite responder de forma rápida a una amplia variedad de antígenos, también al unirse a ellos puede opsonizarlos, es decir facilitar su entrada a células fagocíticas, o su degradación al fijar complemento. (Schroeder HW Jr y Cavacini L, 2010).

1.5.2. Inmunoglobulina D (IgD)

Hasta el momento se desconoce la función específica de esta Ig la cual tiene una vida media de 3 días. Se ha sugerido que la IgD podría estar involucrada en la sobrevivencia del LcB durante su desarrollo. En humano, la IgD en humano se expresa en la membrana de los LcB al salir de la médula ósea para migrar y poblar a los OLS, en esta etapa el LcB expresa tanto IgM⁺ como IgD⁺, a estos LcB IgM⁺ IgD⁺ se les conoce como LcB naïve, los

cuales salen de la médula ósea para poblar a los OLS. Los LcB naïve al reconocer a su antígeno pierden la expresión de IgD. (Schroeder HW Jr y Cavacini L, 2010). A diferencia del humano, la maduración de los LcB de ratón termina en el bazo, y en este sitio anatómico expresa a la IgD (Gutzeit C, et al., 2018).

1.5.3. Inmunoglobulina G (IgG)

Es la inmunoglobulina con la vida media más larga (en promedio 20 días), la más abundante en el suero y está en forma monomérica. La IgG es una Ig de alta afinidad y baja avidéz por el antígeno y es el anticuerpo que se produce en mayor cantidad en respuestas inmunes secundarias, es decir después del segundo encuentro con el antígeno y se produce principalmente en reacciones de CG. Dadas las características de la IgG tiene una gran capacidad de neutralización de toxinas y virus, y una vez unida a estos microorganismos o células puede fijar complemento y eliminarlos (Schroeder HW Jr y Cavacini L, 2010).

1.5.4. Inmunoglobulina A (IgA)

La IgA es la Ig más abundante en las mucosas y en secreciones como la saliva y la leche materna, con una vida media de 6 días. En suero se encuentra generalmente de forma monomérica mientras que en las mucosas en forma dimérica, unida con la cadena J a través de sus regiones Fc. Como es de esperarse la IgA juega un papel crítico en la protección de las mucosas ya que evita que los patógenos se adhieran a su superficie, también puede neutralizar toxinas y virus y no induce respuestas inflamatorias, sin embargo, no fija complemento. (Schroeder HW Jr y Cavacini L, 2010).

1.5.5 Inmunoglobulina E (IgE)

La IgE es la Ig con la vida media más corta, de 2 a 3 días y sus concentraciones en suero son las más bajas de todos los anticuerpos séricos. La IgE está asociada con la hipersensibilidad antigénica como las reacciones alérgicas y en las respuestas contra

parásitos como helmintos. La participación de la IgE en las reacciones de hipersensibilidad se explica en gran parte por que tanto las células cebadas como los basófilos tienen receptores de alta afinidad por la región Fc de la IgE, lo que induce la desgranulación y la liberación de varios mediadores inflamatorios. Cabe mencionar que son esenciales para la producción de esta IgE *in vivo* la interacción CD40-CD40L y las citocinas IL-4 e IL-13 (He JS, et al., 2015).

1.6. IgA en el tracto gastrointestinal

Las superficies de las mucosas están en contacto con una gran diversidad de microorganismos como bacterias patógenas y comensales, archeas, virus, protozoarios, hongos, entre otros. Esto obliga al organismo y en particular al SI a desarrollar una estrategia flexible entre las respuestas del SI innatas y adaptativas, para asegurar la homeostasis y la simbiosis con la microbiota. Una de las respuestas inmunes más notorias, en el tracto gastrointestinal, es la producción de la IgA (Chen K, et al., 2020).

La IgA es la Ig más abundante en las mucosas con una producción de hasta 4 mg por día, se encuentra principalmente en las superficies de las mucosas del tracto respiratorio, gastrointestinal y en menor cantidad en el reproductor (principalmente en machos). La producción de esta Ig en los órganos del GALT (por sus siglas en inglés de “Gut Associated Lymphoid Tissue”), constituido por el MLN, las PP y los folículos linfoides aislados ILF (por sus siglas en inglés “Isolated Lymphoid Follicles”) es inducida, esencialmente, por los antígenos provenientes de la dieta y de la microbiota. Existe una relación importante entre los antígenos de la dieta, la microbiota y la producción de IgA, la cual se ha demostrado en ratones “Germ free” en los que la IgA intestinal se encuentra disminuida significativamente (Hara S, et al., 2019).

De esta manera, la IgA está considerada como la primera línea de defensa de la inmunidad adaptativa en el lumen intestinal puesto que participa en limitar la entrada de los antígenos, evitando que se adhieran a las superficies de las mucosas, disminuyendo su movilidad (bacterias), propagación y virulencia (Gommerman JL, Rojas

OL y Fritz JH, 2014). Por otro lado, se ha demostrado que la IgA puede facilitar la presentación de los antígenos a los LcB para iniciar su diferenciación en CPs e inducir una respuesta humoral (Lamm ME, et al., 1995)

Aproximadamente el 80% de las CPs del organismo se encuentran en el tracto gastrointestinal, debido a que el intestino es un nicho que permite la sobrevivencia de las CPs, gracias a la presencia de citocinas como BAFF (“B cell activating factor”), IL-6, y APRIL (“A proliferation-inducing ligand”) (Mora JR y von Andrian UH, 2008). Estas citocinas pueden ser expresadas por células del SI o por células estromales presentes en el microambiente (Forchielli ML y Walker WA, 2005).

Existe evidencia de que las alteraciones en la producción de IgA incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas y autoinmunes intestinales (Gommerman JL, et al., 2014), puesto que alteraciones en la producción de la IgA modifican la composición de la microbiota e inician procesos inflamatorios que dañan a las células epiteliales; es decir es, IgA es esencial para la homeostasis del tejido intestinal (Cerutti A., 2008).

1.7. La Interacción CD40-CD40L

Como se mencionó anteriormente, la interacción entre los receptores CD40 y CD40 ligando (CD40L) está involucrada en las reacciones TD de los LcB. Esta interacción es esencial para la formación del CG y por lo tanto para la diferenciación de los LcB, por lo que alteraciones en cualquiera de las dos moléculas resulta en la ausencia del CG. Además de participar en la inducción de la formación del CG, la interacción entre CD40-CD40L interviene en otros procesos como la activación de varios tipos celulares ajenos al CG, como es el caso de la expresión de moléculas de adhesión, la expresión de citocinas y señales de sobrevivencia (Figura 7) (Chatzigeorgiou A, et al., 2009).

1.7.1 La molécula CD40

CD40 es una glico-proteína de tipo I transmembranal, con un peso molecular aproximado de 47-50 KDa, constituida por 277 aminoácidos (a.a.) y es miembro de la superfamilia de TNF (por sus siglas en inglés de “Tumor Necrosis Factor”). Esta molécula funciona como receptor, y puede encontrarse sobre en la membrana celular como monómero, dímero o trímero y en algunas ocasiones puede presentarse en forma soluble.

CD40 se expresa en los LcB, macrófagos, DCs, células endoteliales, epiteliales, musculares, queratinocitos, fibroblastos y plaquetas. La unión de CD40 con su ligando puede activar a estas células, e inducir la liberación de citocinas, la proliferación celular, proporcionar señales anti apoptóticas, etc (Korniluk A, et al., 2014).

Experimentos *in vitro* con LcB, demostraron que la unión de CD40 con su ligando CD40L promueve una alta proliferación, la expresión de moléculas como CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, MHC-II, moléculas de adhesión (como I-CAM y V-CAM) y producción de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-12, IL-2, IL-10 y linfotoxina-alfa. La unión de CD40 con su ligando en conjunto con la estimulación provocada por las citocinas IL-4, TGF- β y APRIL influye el CSR de los LcB a isotipos específicos (Kawabe T, et al., 1994). Por otro lado, se ha descrito que el papel principal de la forma soluble de CD40 es el bloquear cantidades altas del CD40L.

1.7.2 El CD40 ligando

Al igual que CD40, CD40L es una proteína transmembranal tipo II, constituida por 261 a.a., que también forma parte de la familia de los TNF. Además de la forma transmembranal del CD40L de 39 KDa, también se describió una forma soluble de 18 KDa (Chatzigeorgiou A, et al., 2009). Varias poblaciones celulares expresan CD40L como los: linfocitos T (LcT) CD4⁺ activados, las plaquetas activadas, los monocitos, las NKs (“Natural killers”), las células cebadas y los basófilos (Karimi MH y Pourfathollah AA, 2012).

El CD40L se expresa como un homotrímero únicamente cuando las células T CD4⁺ son activadas por la interacción de su TCR con el antígeno y del reconocimiento del MHC-II

por la molécula CD4. Estas interacciones ocurren en la sinapsis inmunológica entre el linfocito B y el linfocito T. Una vez concluida dicha sinapsis, el efecto ejercido por la interacción CD40-CD40L es neutralizado a través de su degradación, llevada a cabo por el linfocito T, y mediante su bloqueo realizado por el CD40 soluble, evidenciando que la molécula CD40L está altamente regulada (Loskog A y Tötterman TH., 2007).

CD40L soluble es producida principalmente por los LcT CD4 y por las plaquetas mientras que activa principalmente a las DCs, macrófagos y neutrófilos, así como en la producción de citocinas, en particular el IFN-gamma (França TT, et al., 2019).

1.7.3 Interacción entre CD40-CD40L

Diferentes procesos biológicos como la activación celular, la producción de citocinas, la expresión de moléculas de adhesión, la activación de cinasas y la sobrevivencia celular se llevan a cabo, entre otras cosas, gracias a la interacción entre el CD40-CD40L, principalmente como resultado de la activación de las proteínas TRAF (2, 3 y 6), que conllevan a la activación de NFκB que culmina en la regulación de la transcripción de una pléyade de moléculas (Chatzigeorgiou A, et al., 2009). CD40 además de su vía canónica de NFκB, tiene una vía alterna mediada por Jak3, que a su vez activa a STAT-3, STAT-5 y STAT-6; esta vía alterna es la frecuentemente observada en DCs y monocitos (Chatzigeorgiou A, et al., 2009). Hasta el momento no se ha demostrado que la interacción CD40-CD40L este involucrada en la ontogenia de las células durante esta etapa.

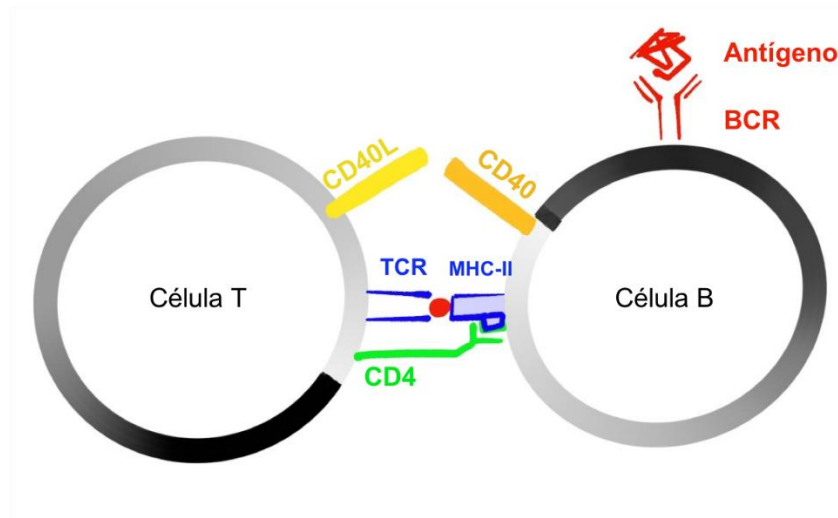


Figura 7. Moléculas necesarias para que ocurra la interacción CD40-CD40L entre la célula T y B.

1.8. Deficiencias en la interacción CD40-CD40L

Mutaciones en las moléculas CD40 o CD40L, en moléculas involucradas en la vía de señalización de NFκB (como TRAF 2, 3 y 6), en moléculas que participan en la SHM (AID) y en la reparación del DNA, están asociadas en lo que se conoce como los síndromes de hiper IgM en humanos (HIGM). Estos pacientes se caracterizan por presentar enfermedades recurrentes de vías respiratorias y del tracto gastrointestinal, así como enfermedades ocasionadas con patógenos oportunistas, desde la infancia. Se caracterizan por niveles séricos elevados o normales de IgM, mientras que los niveles de las otras Igs (IgG, IgA) están disminuidas significativamente o son indetectables (IgE). La mayoría de estos pacientes presentan mutaciones en el CD40L, mostrando que la interacción CD40-CD40L es esencial para la formación del CG, lo que afecta la diferenciación de los LcB y el cambio de isotipo de las Igs. (Karnell JL, et al., 2018; Meng X, et al., 2018). En la ausencia del CG (vía TD), los LcB se diferencian por medio de reacciones TI, de estas reacciones resultan en su mayoría CPs productoras de IgM con una baja afinidad ya que estos LcB no llevan a cabo la SHM, así como también el número de células B de memoria están disminuido significativamente.

Por otro lado, estudios realizados en pacientes con HIGM demostraron que la HIGM se caracteriza por niveles bajos de IgAs polireactivas, que reconocen antígenos de la dieta y la microbiota comensal con una baja afinidad, lo cual está asociado con respuestas TI (Macpherson AJ, et al., 2000).

1.8.1. IgA en ratones deficientes del CD40L

Al analizar las concentraciones de Igs en ratones deficientes del CD40L, se observaron concentraciones séricas de Igs similares a las descritas en pacientes con HIGM es decir: niveles de IgM similares o elevados, de IgG e IgA significativamente menores, ausencia de IgE y CG en bazo y ILNs en comparación con ratones silvestres (Renshaw BR, et al., 1994) Por otro lado, al analizar las concentraciones de Igs en las heces de ratones deficientes en CD40L se encontró que las concentraciones de IgA fueron significativamente mayores comparados con los ratones silvestres (Bernal-Reynaga R, et al., 2012).

Estos datos muestran que la producción de IgA en ratones deficientes del CD40L se encuentra alterada presentando niveles bajos de IgA tanto en suero como en el tracto gastrointestinal. Esto permite plantearnos la interrogante sobre la fuente de origen de las IgAs producidas en exceso en el tracto gastro intestinal de los ratones deficientes del CD40L, que carecen de centros germinales.

2. JUSTIFICACIÓN

Las células productoras de anticuerpos son las células plasmáticas (CPs). Estas células se diferencian a partir de linfocitos B activados, principalmente en la reacción de Centro Germinal (CG) en los órganos linfoides secundarios (OLS). La interacción entre CD40 (Linfocitos B) y CD40L (Linfocitos T activado) es crucial en la respuesta de linfocitos B a través de la formación de CG, en la hipermutación somática que conlleva a la maduración de la afinidad de los anticuerpos, en el desarrollo de la memoria de LcB, y en la diferenciación a CPs. En los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} se reportan concentraciones bajas de la IgA en suero mientras que en heces se encontraron concentraciones significativamente elevadas en comparación con el ratón silvestre. Hasta el momento se desconoce el lugar y los mecanismos de la producción de IgA intestinal en estos ratones.

3. HIPÓTESIS

En los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} las CPs productoras de IgA provienen de reacciones extra foliculares de los órganos linfoides secundarios (OLS) asociados al intestino.

4. OBJETIVO

Identificar y localizar a las células plasmáticas (CPs) productoras de IgA en el bazo, en el ganglio inguinal (ILN) y en los OLS asociados al intestino, en el ganglio mesentérico (MLN) y las placas de Peyer (PP) en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y en ratones C57BL/6 silvestres (WT).

4.1. Objetivos particulares

1. Analizar y comparar la distribución de la IgA en el intestino delgado de los ratones WT y los ratones C57BL6-*cd40*^{-/-}.
2. Evaluar la presencia de CG en los OLS asociados al intestino (MLN y las PP) y en los no asociados al intestino (bazo y el ILN) en ratones WT y ratones C57BL6-*cd40*^{-/-}.
3. Evaluar y comparar la presencia y la distribución de AID (“activation-induced cytidine deaminase”) en el MLN de los ratones WT y C57BL6-*cd40*^{-/-}.
4. Analizar la distribución de los LcB y los LcT en los OLS asociados al intestino (MLN y las PP) en ratones WT y ratones C57BL6-*cd40*^{-/-}.
5. Caracterizar y comparar la morfología de los OLS no asociados al intestino (bazo, los ILN) y los OLS asociados al intestino (el MLN y las PP) entre ratones WT y C57BL6-*cd40*^{-/-}.
6. Identificar y localizar *in situ* a las CP IgA (CD138+IgA+) en los OLS no asociados al intestino (bazo y el ILN) y en los OLS asociados al intestino (PP y GM) en ratones C57BL6-*cd40*^{-/-} y en ratones WT.
7. Cuantificar en los lavados peritoneales, el bazo, el ILN, las PP y el MLN, a los LcB “naïve” (IgD⁺IgM⁺), LcB-IgA⁺, CPs totales (CD138⁺), CPs- IgA⁺, IgG⁺, IgM⁺ y a los LcB1 (CD19⁺CD11b⁺CD5⁺) en ratones C57BL6-*cd40*^{-/-} y WT.
8. Evaluar la expresión de CD40 y TGFβR1 en la superficie de los LcB en ratones WT y ratones C57BL6-*cd40*^{-/-}.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratones silvestres C57BL/6 (WT) y ratones C57BL/6-*cd40l*^{-/-} (6 por grupo). En ellos, se realizaron lavados peritoneales y se obtuvieron los OLS de interés (bazo, ILN, MLN y PPs). Por un lado, los OLS se incluyeron en medio de criopreservación para realizar cortes histológicos y tinciones de inmunofluorescencia para analizar poblaciones de LcB. Por otro lado, se hicieron suspensiones celulares de los OLS y junto con los lavados peritoneales se analizaron las poblaciones de los LcB por medio de citometría de flujo (Figura 8). Los detalles de cada procedimiento se describen a continuación.

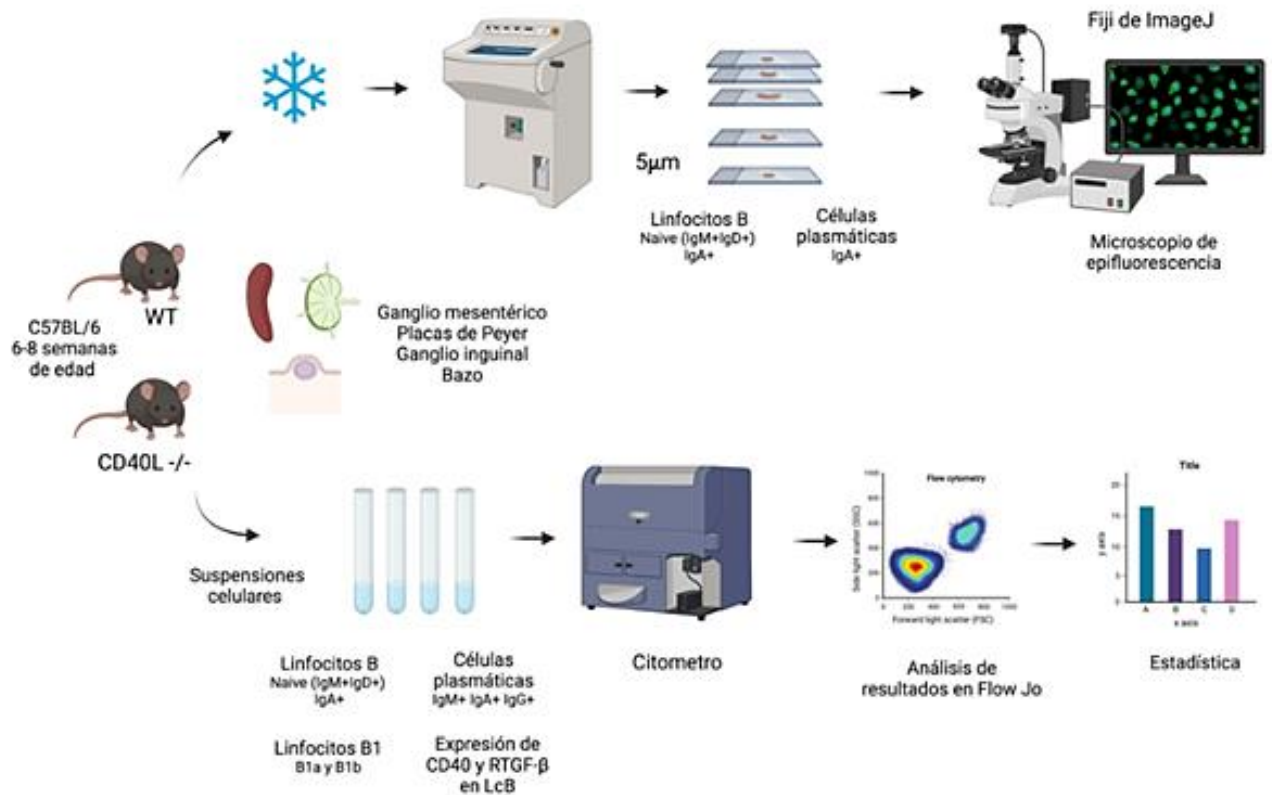


Figura 8. Diagrama de la estrategia experimental empleada en los experimentos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Animales

Ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, fueron evaluados para la identificación de patógenos intestinales murinos comunes, una vez al año y particularmente, cada mes para *Escherichia coli* (*E. coli*). Los ratones libres de patógenos y de *E. coli* con una edad de seis a ocho semanas fueron utilizados en todos los experimentos realizados en el estudio, los cuales se llevaron a cabo de acuerdo con la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a los lineamientos institucionales de animales para el cuidado y uso de animales de experimentación. Además, se contó con el Protocolo: 0070-13 de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL)-CINVESTAV-IPN, aprobado por el Comité Interno Para El Cuidado Y Uso De Los Animales De Laboratorio (CICUAL).

6.2. Obtención de las muestras

Los animales empleados en el estudio fueron sacrificados de acuerdo con las normas del buen cuidado de animales (UPEAL-CINVESTAV). Una vez sacrificados los ratones, se obtuvieron las placas de Peyer (PP), los ganglios mesentéricos (MLN), los ganglios inguinales (ILN) y los bazo de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, se removió el tejido graso de los órganos y se limpiaron con PBS 1X (pH 7.4). Los órganos se midieron en centímetros utilizando un Vernier y se tomaron fotografías con una cámara Canon Rebel 5Ti (Huntington, Nueva York, U.S.). Después de obtener los bazo, los ILN, las PP, y los MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} (N=3, por grupo), estos se embebieron en Tissue tek (Leica, IL, EE. UU.), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.3. Inmunofluorescencia *in situ* del bazo, ganglio inguinal, ganglio mesentérico y placas de Peyer

6.3.1. Identificación de los centros germinales (CG)

Para la identificación de los CG se utilizó el marcaje con IgD que está presente en todas los LcB naïve que se localizan principalmente dentro de los folículos de células B de los OLS, los CG se pueden identificar por la pérdida del marcaje con IgD sobre la superficie en los linfocitos B.

Los órganos criopreservados se cortaron de un grosor aproximadamente de 5-6 μm , en un criostato Leica (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos tratados con Poly-L Lysine y se fijaron utilizando acetona fría. Después de secarse a temperatura ambiente, las laminillas se almacenaron a -20°C . El día de la tinción, los portaobjetos se rehidrataron con BSA al 0.2 %, se bloquearon con el reactivo de bloqueo universal Power Block (BioGenex, CA, EE. UU.) durante 15 min. Posteriormente, las laminillas se incubaron con anti-IgD (BD Pharmingen, 553438, clona IA6-2 RUO, dilución 1:300) por 1 h a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con BSA 0.2% (diluido en PBS 1X) y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-rata Alexa Fluor 594 (Life Technologies, A21209, dilución 1:2000). Después de 3 lavados con BSA 0.2% se agregó DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para marcar los núcleos celulares. Las muestras se montaron con glicerol al 90% (diluido en PBS 1X) y se tomaron fotografías en un microscopio Olympus BX51/ con una lámpara de epifluorescencia Olympus RFL-T. Las imágenes se analizaron con los programas software, Image-ProPlus 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, USA) y Fiji Image J (National Institutes of Health, USA).

6.3.2. Identificación de células B naïve y CPs positivas para IgA

A partir de cortes resguardados a -20°C , los tejidos se rehidrataron con BSA al 0.2 % (diluida con PBS 1X pH 7,4), se bloquearon con el reactivo de bloqueo universal Power Block (BioGenex, CA, EE. UU.) durante 15 min. Se incubaron durante 1 h con anticuerpos primarios anti-ratón: anti-IgD (BD Pharmingen, 553438, dilución 1:300), anti-IgM (Southern Biotech, 20-10-08 dilución 1:500), anti-IgA biotinilada (eBioscience, 13-5994-82, clona 11-44-2, dilución 1:1000) y anti-CD138 (BD Pharmingen, 553712, clona 281-2, dilución 1:300). Después de 3 lavados, los portaobjetos marcados con IgD, IgM y CD138 se incubaron con un anticuerpo secundario anti-rata Alexa Fluor 594 (Life Technologies, A21209, dilución 1:2000) durante 1 h a temperatura ambiente. Mientras que los portaobjetos marcados con IgA biotinilada se incubaron con estreptavidina acoplada con Alexa Fluor-488 (Invitrogen, 511223, dilución 1:2000) durante 30 min a temperatura ambiente. Todos los portaobjetos se incubaron con DAPI durante 5 min para teñir los núcleos. Los controles negativos no se incubaron con anticuerpos primarios, mientras que los portaobjetos para los controles positivos para el marcaje secundario se analizaron junto con anticuerpos anti-B220 (Alexa Fluor 594) y CD169 biotinilado (estreptavidina acoplada Alexa Fluor-488). Los portaobjetos se lavaron 3 veces y se montaron en glicerina al 90% (diluida con PBS 1X pH 7,4). Todas las muestras se visualizaron utilizando objetivos de 10X y 40X de un microscopio Olympus BX51/lámpara de epifluorescencia Olympus RFL-T, acoplado a una cámara Olympus U-CMAD3 (Olympus Corporation, Japón), las imágenes se analizaron con el software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, EE. UU.) y el software Fiji Image J (Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.).

6.4. Citometría de flujo

Se realizaron suspensiones celulares mediante un macerado manual de los OLS de interés (bazo, MLN, ILN, PPs). Las células en suspensión de la cavidad peritoneal se obtuvieron por medio de un lavado peritoneal.

6.4.1. Lavado peritoneal

Ambas cepas de ratón fueron inyectadas intraperitonealmente con 5 mL de PBS 1X (pH 7.4) y se realizó un masaje en el área peritoneal para despegar las células adheridas en la cavidad. Posteriormente, el PBS fue extraído con el uso de una jeringa (con una aguja 21G x 32mm).

6.4.2. Tinciones de suspensiones celulares para citometría de flujo

Las suspensiones celulares (de todos los órganos y del lavado peritoneal) se bloquearon con el reactivo de bloqueo universal Power Block (BioGenex, CA, EE. UU.) durante 15 min y se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-CD19 (BD Pharmingen, 563148, clona 1D3, dilución 1:300), anti-CD5 (BD Pharmingen, 553023, clona 53-7.3, dilución 1:200) anti-CD11b BD Pharmingen (BD Pharmingen 550993, clona M1/70, dilución 1:200), anti-IgD (eBioscience, 12-5993-83, clona 11-26c, dilución 1:800), anti-IgM (Southern Biotech, 1020-02, dilución 1:500), anti-IgA biotinilado (eBioscience,13-5994-82, dilución 1:1200). Para la identificación de CPs se utilizó el anticuerpo anti-CD138 (BD Pharmingen, 561070, clona 281-2, dilución 1:300). Después de 3 lavados (1500 rpm por 5 min con PBS 1X), las muestras que requirieron una tinción intracelular fueron tratadas con el kit BD Cytotfix/Cytoperm (San Jose, CA) por 20 min e incubadas posteriormente con los anticuerpos: anti-IgM FITC (Southern Biotech, 1020-02, dilución 1:500), anti-IgG APC (Southern Biotech, 17-4010-82, dilución 1:600) y anti-IgA biotinilado (eBioscience,13-5994-82, dilución 1:1200) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS 1X (pH 7.4), se incubaron con anti-IgA biotinilado y con estreptavidina acoplada a Alexa Fluor-488 (Invitrogen, 511223, dilución 1:2000) por 15 min. Todas las

muestras se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las muestras fueron analizadas en un citómetro BD LSR Fortessa X-20 (Franklin Lakes, New Jersey, U.S) utilizando el software BD FACS Diva V.9 (New Jersey, U.S.). Los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo vX.0.8 (Ashland, OR).

La estrategia de análisis utilizada para evaluar a las diferentes poblaciones de LcB, se muestra en la Figura 9. Las poblaciones de LcB se identificaron con los siguientes marcadores: LcB naïve (IgM^+IgD^+), LcB activadas (IgM^+), CPs ($CD138^+$), células IgA-positivas (IgA^+), y CPs IgA-positivas ($CD138^+IgA^+$).

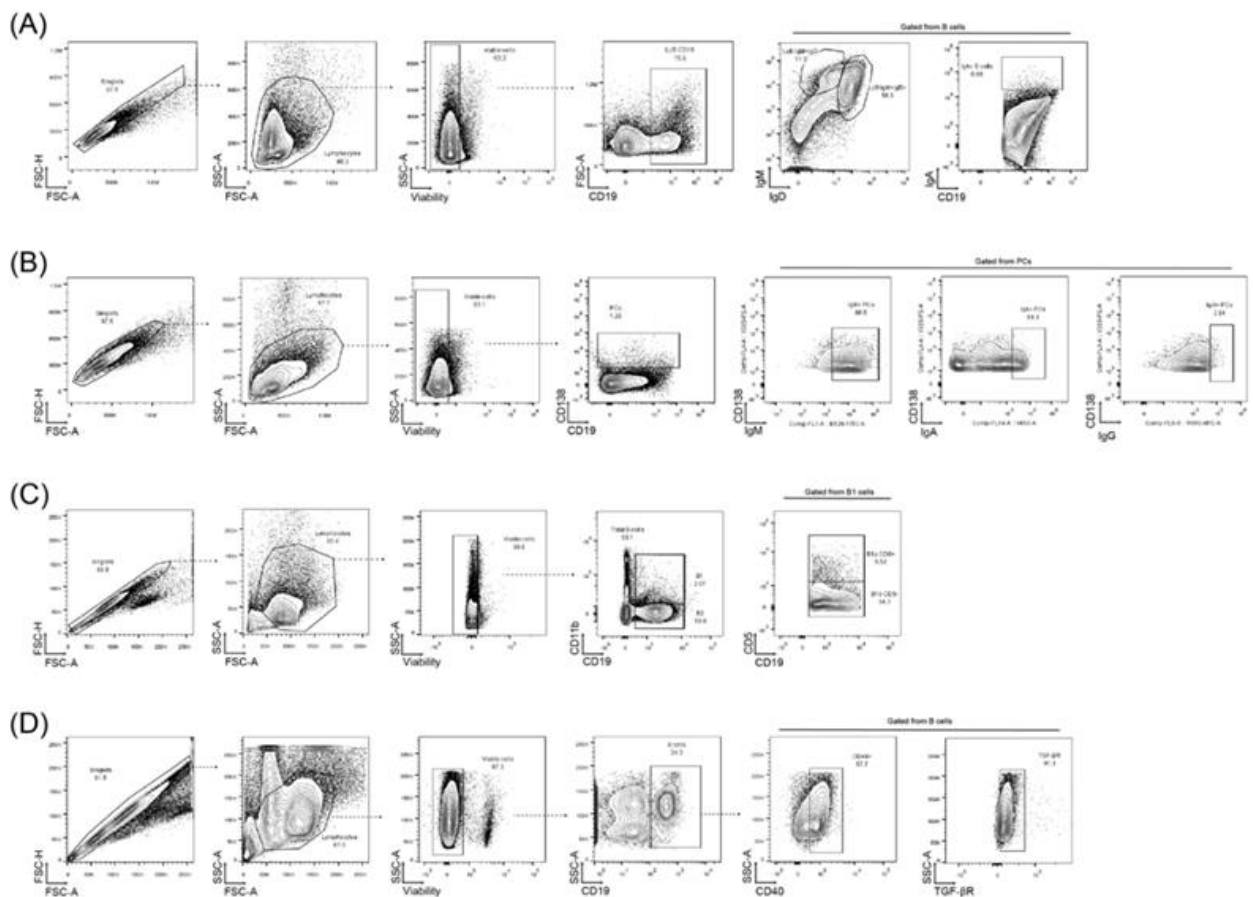


Figura 9. Estrategia de análisis de citometría de flujo. A) Linfocitos B totales, LcB naïve (IgM^+IgD^+) y LcB IgA^+ . B) Células plasmáticas totales, CP IgM^+ , IgA^+ e IgG^+ . C) Linfocitos B1 totales, B1a y B1b. D) CD40 y Receptor 1 de TGF- β .

6.5. Lavado peritoneal, conteo celular y cytopspin

Los Lavados peritoneales (mostrado anteriormente) de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} (6 ratones/grupo) fueron marcados con los mismos anticuerpos previamente descritos (anti- IgD, IgM, IgA, CD19, CD11b, CD5 y CD138). Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer para tener aproximadamente entre 30 y 50 mil células por 100 mL. Posteriormente, se colocaron 100 mL de las muestras en las cámaras de carga del cytopspin y se realizó el cytopspin (Shandon Cytospin 4, Thermo, Waltham, Massachusetts, U.S.) a una velocidad de 350 rpm por 5 min.

6.6. Análisis estadístico

Los valores se expresan como media \pm el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se calculó mediante la realización de una prueba *t* de Student no pareada comparando los ratones WT y los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism ver.8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

7. RESULTADOS

7.1. Distribución *in situ* de células IgA positivas en heces fecales de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal

Se ha reportado que las concentraciones de IgA en las heces de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, en estado basal, son significativamente más altas que en los ratones WT. (Bernal-Reynaga R, et al., 2013), sin embargo, las concentraciones de IgA séricas del ratón C57BL6-*cd40l*^{-/-} son significativamente menores que las del WT. A continuación, describimos la frecuencia y la distribución de las células IgA positivas en el intestino delgado de ambas cepas de ratones, la cual muestra que las células IgA positivas (verde) tienen una distribución similar en ambas cepas observándose sólo dentro de las microvellosidades del intestino Figura 10.

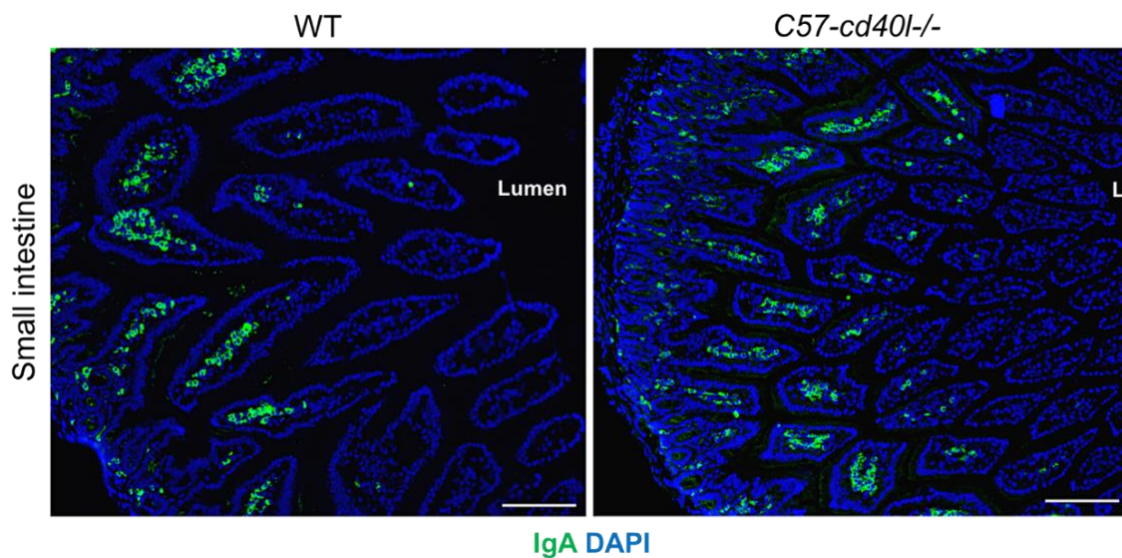


Figura 10. Distribución *in situ* de las células IgA positivas en el intestino delgado en el estado basal de los ratones WT y los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Se muestran las células IgA positivas teñidas en verde y los núcleos celulares teñidos en azul con DAPI. La distribución de las células IgA positivas fue similar en las dos cepas de ratón, observándose en las microvellosidades. Las barras blancas equivalen a 200µm. L= Lumen. Imágenes representativas de seis experimentos independientes (N=4).

7.2. Identificación de los centros germinales en órganos linfoides secundarios de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en estado basal

Al observar en el estado basal una distribución similar de células IgA positivas en el intestino delgado de ambas cepas de ratón, era importante determinar de donde procedían estas Igs. Por lo que se evaluó la presencia de CGs dentro de los OLS asociados al intestino (PP y MLN) y no asociados al intestino (bazo e ILN) en los grupos de ratones. Como se muestra en la Figura 11 panel A, después de identificar a las células IgD⁺ (rojo) que indica a los LcB naïves, cuyos núcleos están teñidos en azul con DAPI, la ausencia de células IgD⁺ dentro del folículo indica la presencia de los CGs (líneas punteadas blancas), los cuales se observaron exclusivamente en las PP y los MLN de los ratones WT (Figura 11 panel A izquierdo). Mientras que no se observaron CGs en las PP y los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (Figura 11 panel A derecho). En ambos OLS asociados al intestino se observaron LcB naïve en los folículos de las dos cepas de ratones (Figura 11).

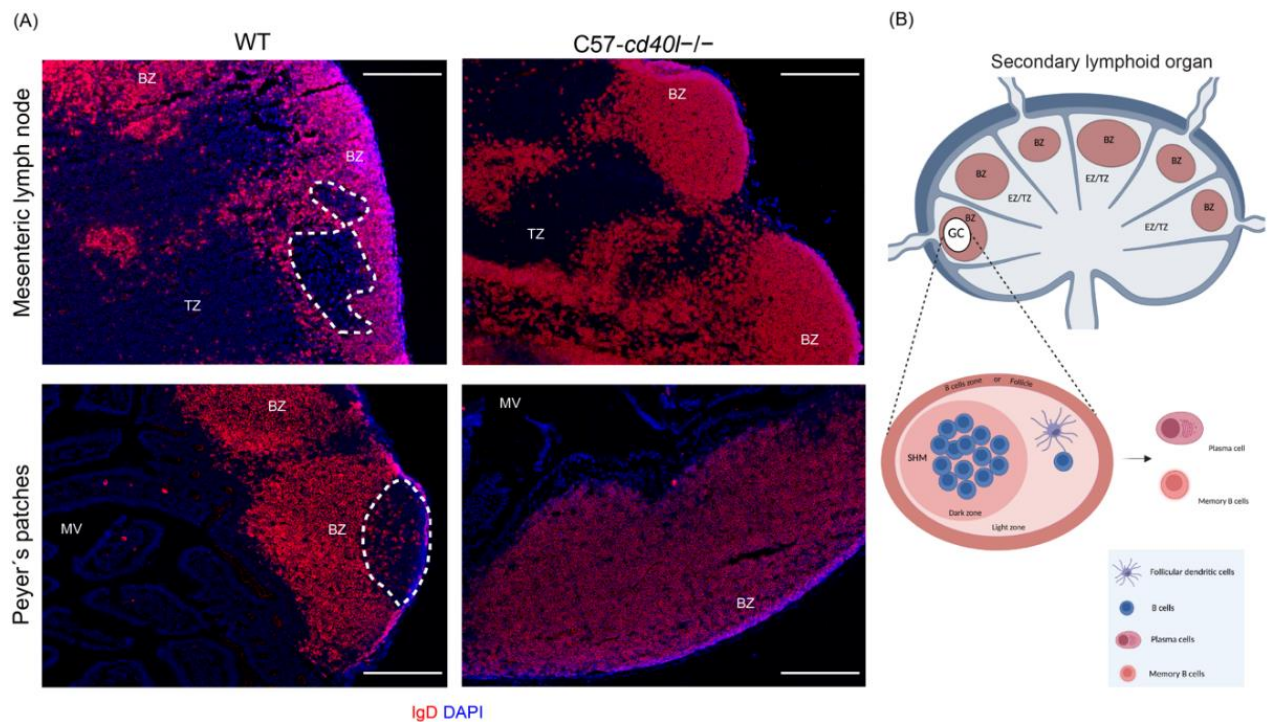


Figura 11. Distribución *in situ e in vivo* de IgD e identificación de CGs en los MLN y las PP en el estado basal en ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. A) se muestran a los LcB naïve (tinción roja) en los MLN y las PP en ratones WT (panel izquierdo) y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (panel derecho). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Los CG son las regiones negativas a IgD dentro del folículo, y se presentan delimitadas por una línea punteada blanca. Éstas solo se observaron en las PP y los MLN de los ratones WT (panel izquierdo). En ambos paneles las áreas rojas indican la zona de células B (BZ) y la zona extrafolicular está teñida en color azul. Las barras blancas equivalen a 200µm. BZ=zona de células B, TZ=zona de células T, EZ=zona extrafolicular y MV=microvellosidades. Imágenes representativas de seis experimentos independientes (N=1 por experimento). B) Esquema de la estructura de un OLS. En rojo, la zona de células B también conocida como folículo, en azul, la zona extrafolicular o zona de células T, y dentro de la BZ el CG en blanco. La ampliación del esquema muestra en el CG la zona oscura que contiene los LcB donde se lleva a cabo la hipermutación somática (SHM) y la zona clara que alberga FDCs que seleccionan positivamente a las células B. BZ=Zona de células B, TZ=Zona de células T y EZ=zona extrafolicular.

Como se ilustra en la Figura 12 en los OLS no asociados al intestino (bazo y los ILN) de ambas cepas de ratón no se identificaron CGs.

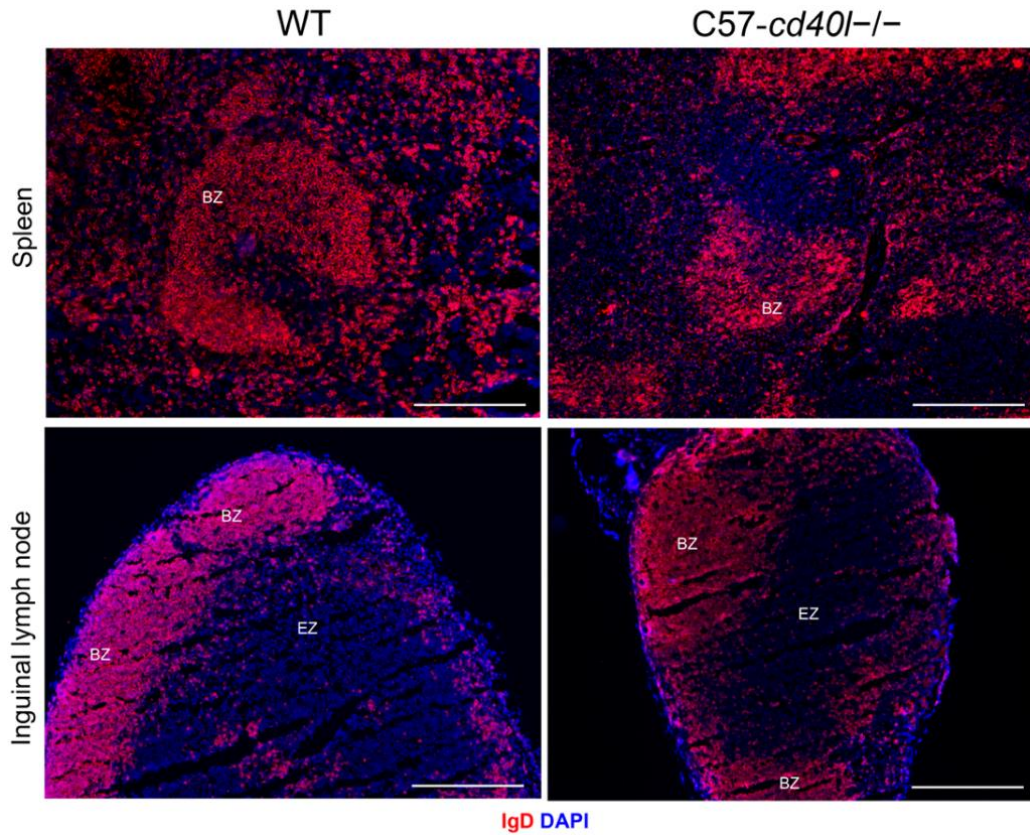


Figura 12. Distribución *in situ e in vivo* de IgD en el bazo y el ganglio linfático inguinal (ILN) en el estado basal de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Se muestran a los LcB naïve (tinción roja) en el bazo y los ILN en ratones WT (panel izquierdo) y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (panel derecho). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Las áreas rojas indican la zona de células B (BZ) y la zona extrafolicular en color azul. No hay presencia de CG en los ratones WT ni en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Las barras blancas equivalen a 200 μm . BZ=Zona de células B, TZ=Zona de células T y EZ=zona extrafolicular. Imágenes representativas de seis experimentos independientes. (N=6).

7.3. Identificación de centros germinales en órganos linfoides secundarios de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en estado basal por medio de la expresión de PNA (“Peanut agglutinin”)

Se tiñeron los tejidos de las PP y los MLN con PNA, que se une específicamente a galactosyl (β -1,3), que se expresa en LcB que entran en proliferación dentro de la reacción del CG y en algunos LcT de la zona extra folicular (Figura 13). El marcaje positivo para PNA, nos permite identificar a los CG (delimitados con la línea blanca punteada), estos se observaron únicamente en los OLS (PP y MLN) de los ratones WT (panel izquierdo).

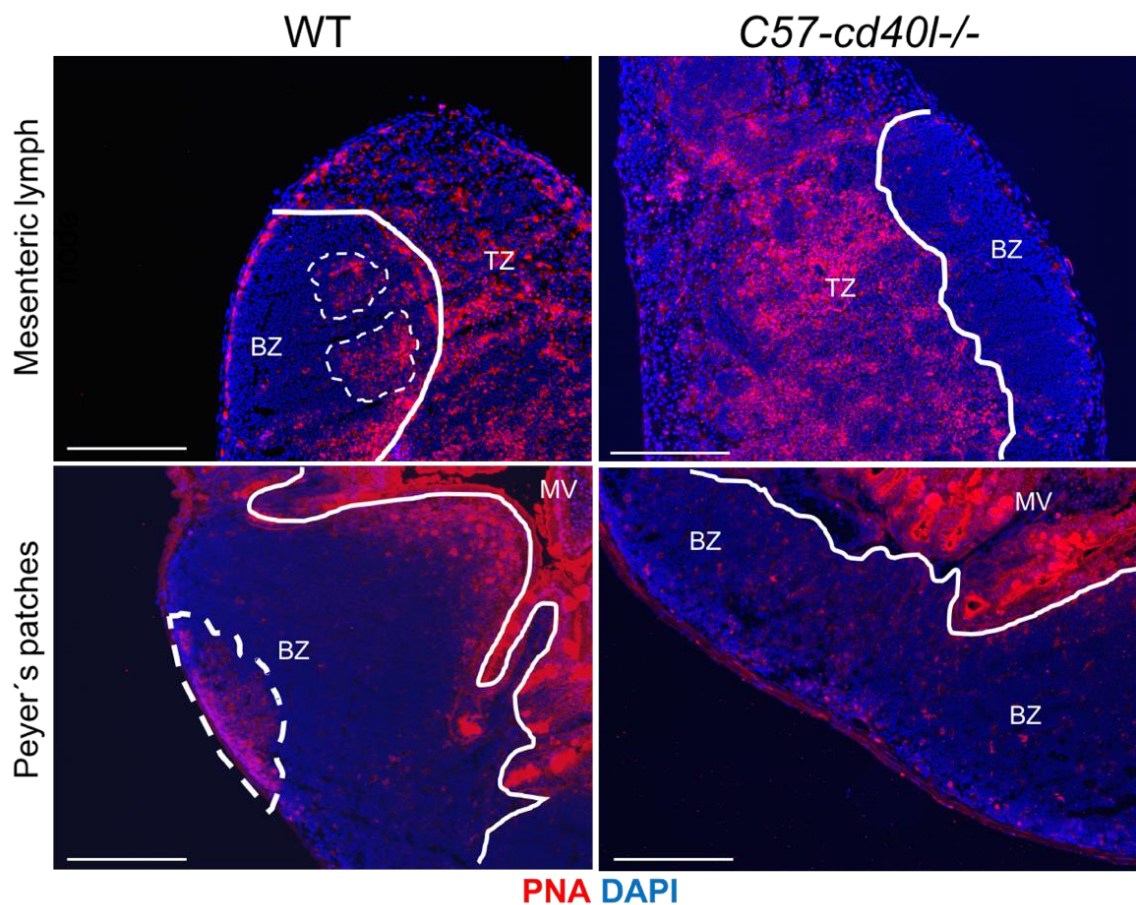


Figura 13. Marcaje de PNA para la detección de GCs en los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer en ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal. El marcaje de PNA se muestra en color rojo y los núcleos celulares en color azul. El panel izquierdo muestra los OLS de los ratones WT y el panel derecho el de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Dentro del folículo se muestra la presencia de los CGs (delimitados con líneas blancas punteadas) tanto en el MLN y en la PP de los ratones WT. Las barras blancas equivalen a 200µm. La línea blanca sólida delimita el área de la Placa de Peyer. BZ= zona de linfocitos B. TZ= zona de linfocitos T o zona extra folicular. MV= microvellosidades. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes (N=3).

7.4. Presencia de células positivas para IgD e IgA en los OLS asociados al intestino en el estado basal de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}

Se realizaron tinciones *in situ* e *in vivo* para identificar LcB naïve (rojo) y células IgA positivas (verde) en ambas cepas de ratones. Esto nos permitió identificar la presencia de las células IgA positivas en ambas cepas de ratones, pero con una distribución diferente (Figura 14). Como se muestra en la Figura 14 panel izquierdo, tanto en las PP como en el MLN del ratón WT, se observó un agregado de células IgA-positivas dentro del CG (líneas de puntos blancas), sugiriendo la presencia de un CG IgA positivo (panel izquierdo). Mientras que en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, que carecen de CGs (panel derecho), se observaron células IgA-positivas esparcidas dentro del folículo de los MLN (flechas blancas) pero no se observaron células IgA-positivas dentro del folículo de las PP y nuevamente observamos células IgA-positivas en las microvellosidades del intestino (panel inferior derecho).

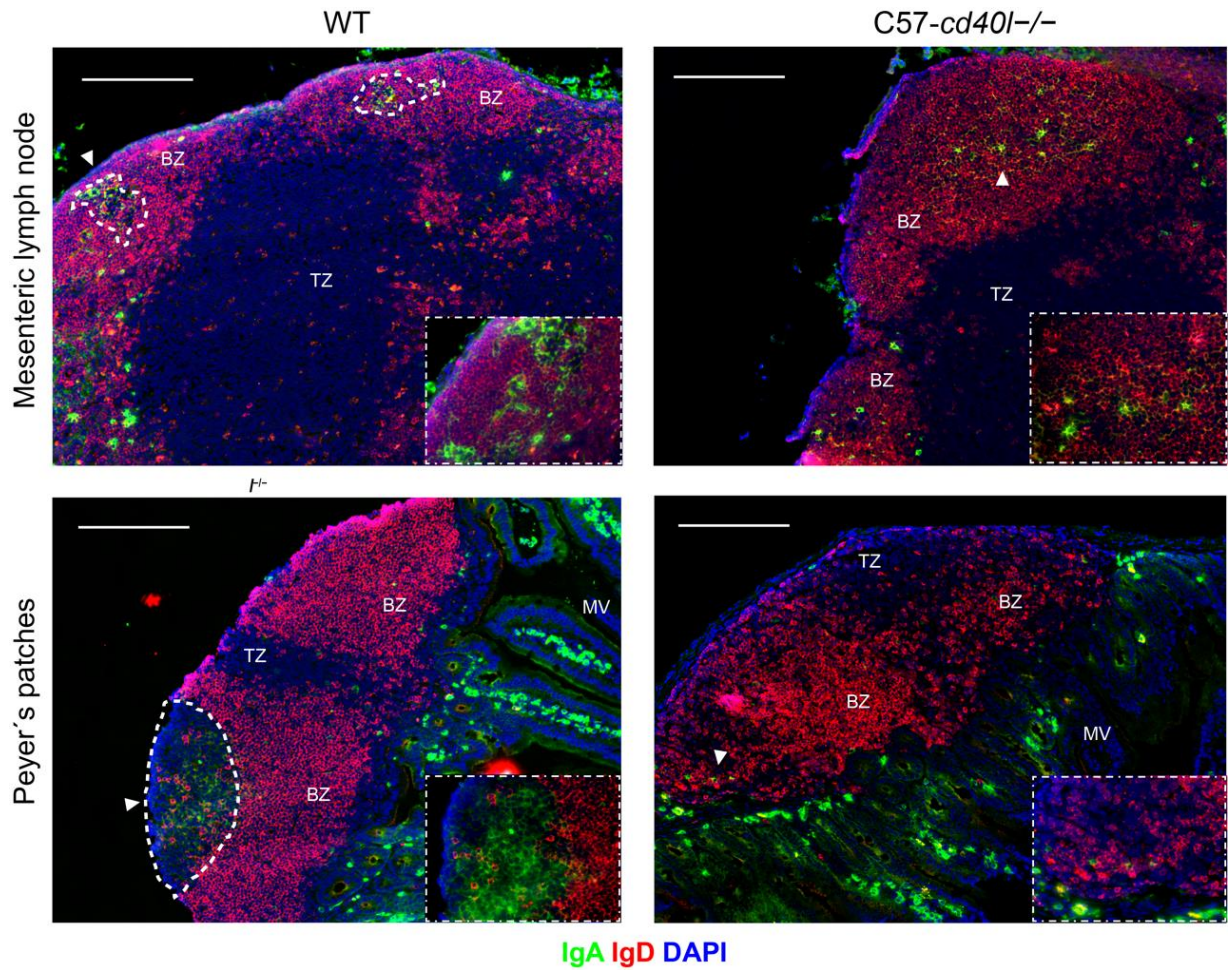


Figura 14. Distribución *in situ* de IgD e IgA, en órganos linfáticos secundarios de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Los MLN y las PP de ratones WT (panel izquierdo) y C57BL6-*cd40l*^{-/-} (panel derecho), se tiñeron para IgD (rojo), células IgA-positivas (verde) y DAPI (azul). Los CG se resaltaron con la línea blanca punteada. Se muestra en la esquina inferior derecha un aumento de 40X. Las flechas blancas señalan a las células IgA positivas (flechas blancas) y las zonas rojas corresponden a los LcB naïve. Las barras blancas equivalen a 200µm. BZ= zona de células B. TZ= Zona de células T. MV= microvellosidades. Imágenes representativas de seis experimentos independientes (N=6).

Como se muestra en la Figura 15, no se observaron diferencias significativas en la distribución y en la frecuencia de las células IgA-positivas y las células IgD-positivas en el bazo, ni en el ILN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}.

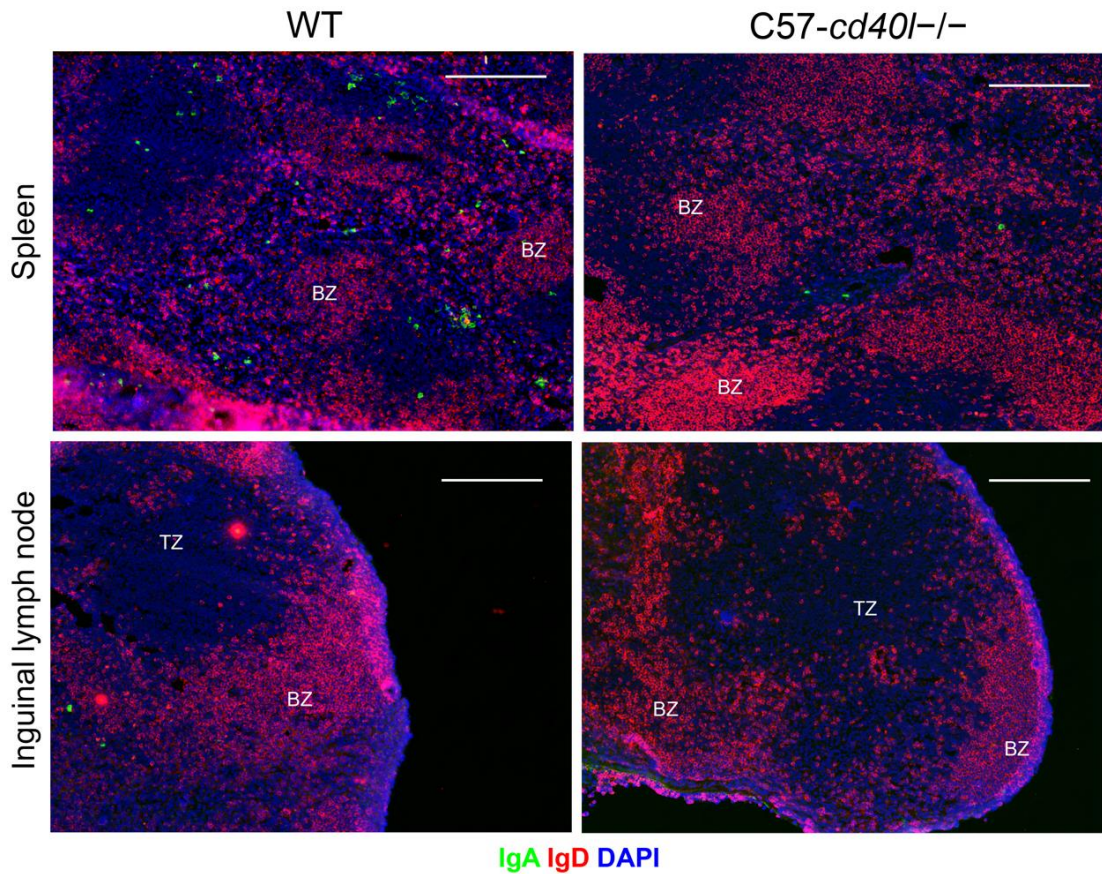


Figura 15. Distribución *in situ* de IgD e IgA en el bazo y el ganglio linfático inguinal (ILN) de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Se muestra el bazo y el ILN de los ratones WT (panel izquierdo) y los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (panel derecho). Las células se marcaron con IgD (rojo), las células IgA-positivas (verde) y los núcleos celulares con DAPI (azul). Las barras blancas equivalen a 200μm. BZ= zona de células B. TZ= Zona de células T. Imágenes representativas de seis experimentos independientes (N=6).

7.5. Expresión *in situ e in vivo* de la enzima AID (activation-induced cytidine deaminase) en el ganglio mesentérico en el estado basal de ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}

Al encontrar células IgA-positivas dentro del folículo del MLN en estado basal en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, era indispensable determinar la expresión y distribución *in situ e in vivo* de AID (“Activation-Induced cytidine Deaminase”), una proteína esencial para el CSR de los LcB. AID marcado en rojo, se identificó principalmente en la ZT o zona extra folicular en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (Figura 16, panel derecho), mientras que en los ratones WT se identificó principalmente dentro del folículo del MLN (delimitado por la línea blanca punteada) (Figura 16, panel izquierdo). Estos resultados indican que en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} que carecen de CG, sus LcB realizan el cambio de isotipo, pero principalmente en la zona extrafolicular lo cual está asociado con respuestas TI.

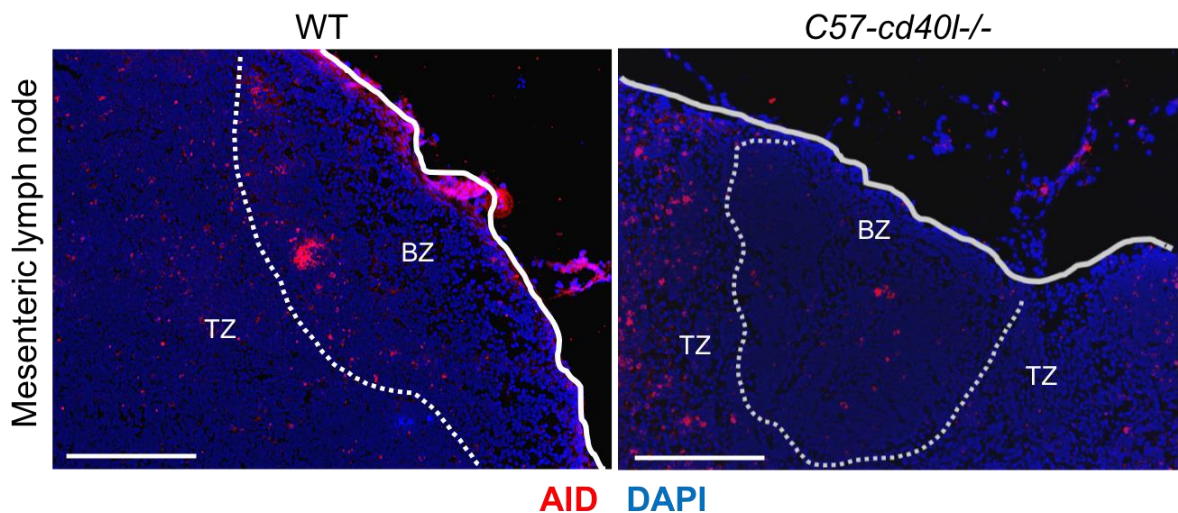


Figura 16. Expresión *in situ e in vivo* de AID en el ganglio mesentérico en el estado basal de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Se observa en ambos MLN la expresión de AID en rojo, los núcleos teñidos con DAPI se observan en color azul. En el C57BL6-*cd40l*^{-/-} el marcaje de AID se observa principalmente en la zona extrafolicular o TZ (panel derecho). La línea blanca punteada delimita la BZ. La línea blanca sólida delimita el órgano linfático. Las barras blancas equivalen a 200µm. BZ= zona de linfocitos B. TZ= zona de linfocitos T o zona extra folicular. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes (N=2).

7.6. Distribución de los linfocitos T $\alpha\beta$ en el ganglio mesentérico en estado basal de ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}

Como se muestra en Figura 17, panel A En los MLN de ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia (rojo) de los LcT $\alpha\beta$, así como un menor número de estos dentro del folículo (BZ) en comparación con los ratones WT, en contraste se encontró una distribución similar de LcT CD8-positivos en ambas cepas de ratón (Figura 17, panel B), sugiriendo que hay una menor cantidad de linfocitos T CD4 en los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}.

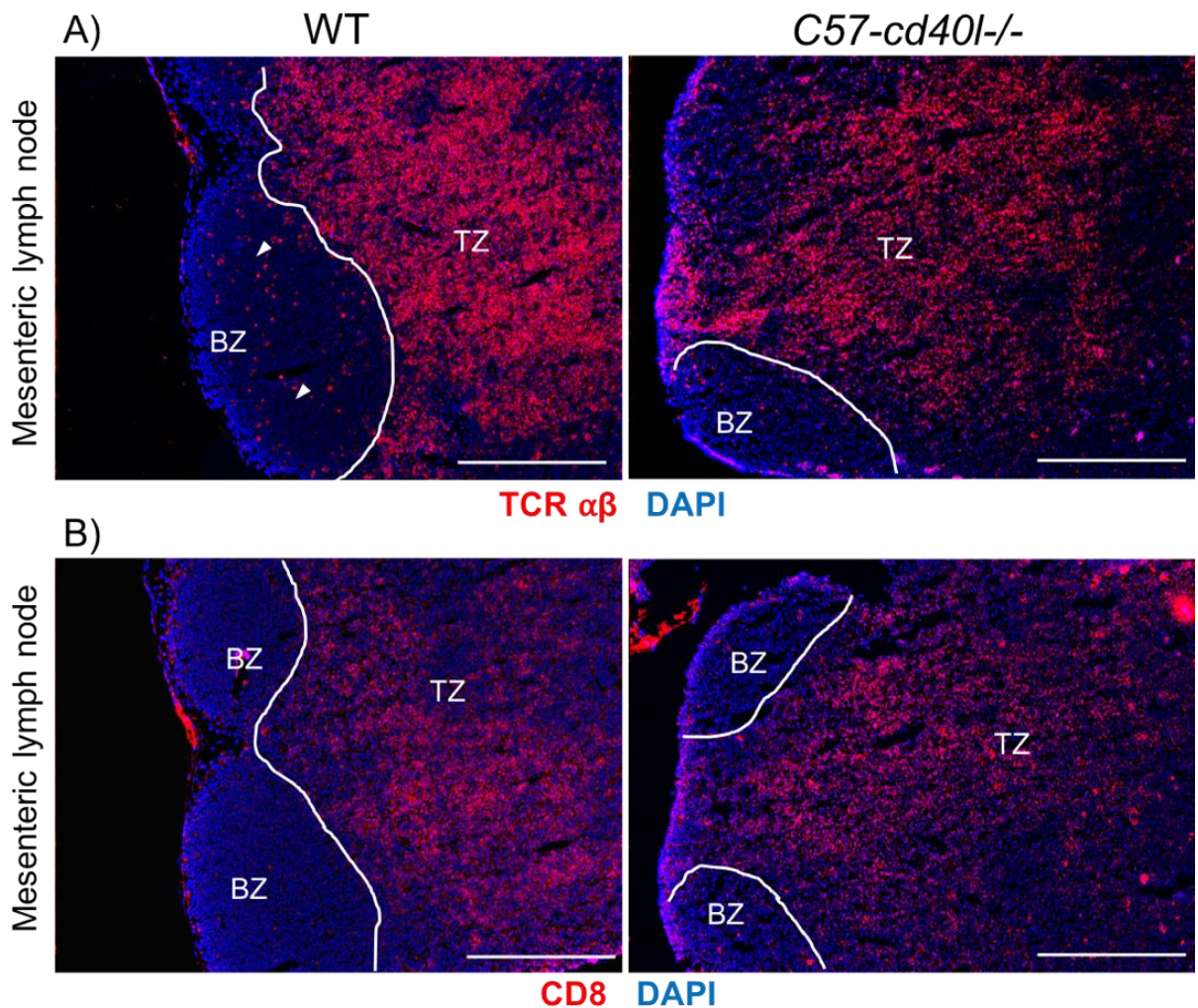


Figura 17. Distribución *in situ* e *in vivo* de LcT totales y de LcT CD8 en el MLN en estado basal de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. A) Los LcT $\alpha\beta$ se muestran en rojo, en MLN de ratones WT (panel izquierdo) y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (panel derecho). Todas las células se tiñeron con DAPI (azul). La mayor intensidad de fluorescencia se observó en los ratones WT en comparación con los C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Las flechas blancas señalan a células T dentro del folículo (BZ). B) Se muestran los LcT $\alpha\beta$ CD8 positivos (tinción roja) en el MLN de ratones WT (panel izquierdo) y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (panel derecho). Todas las células se tiñeron con DAPI (azul). Las barras blancas equivalen a 200 μ m. La línea blanca sólida delimita a la BZ. BZ=zona de células B, TZ=zona de células T o EZ=zona extrafolicular. Imágenes representativas de seis experimentos independientes (N=3).

7.7. Distribución *in situ* de linfocitos T y B en las placas de Peyer de ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}

Como se muestra en la Figura 18, panel izquierdo en el ratón WT se observa la clásica distribución de las zonas de TZ y BZ, así como la formación de un CG (delimitado por una línea blanca punteada), mientras que en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} estas poblaciones se encuentran mezcladas sin formar zonas específicas delimitadas y no se observa la formación de un CG Figura 18 panel derecho.

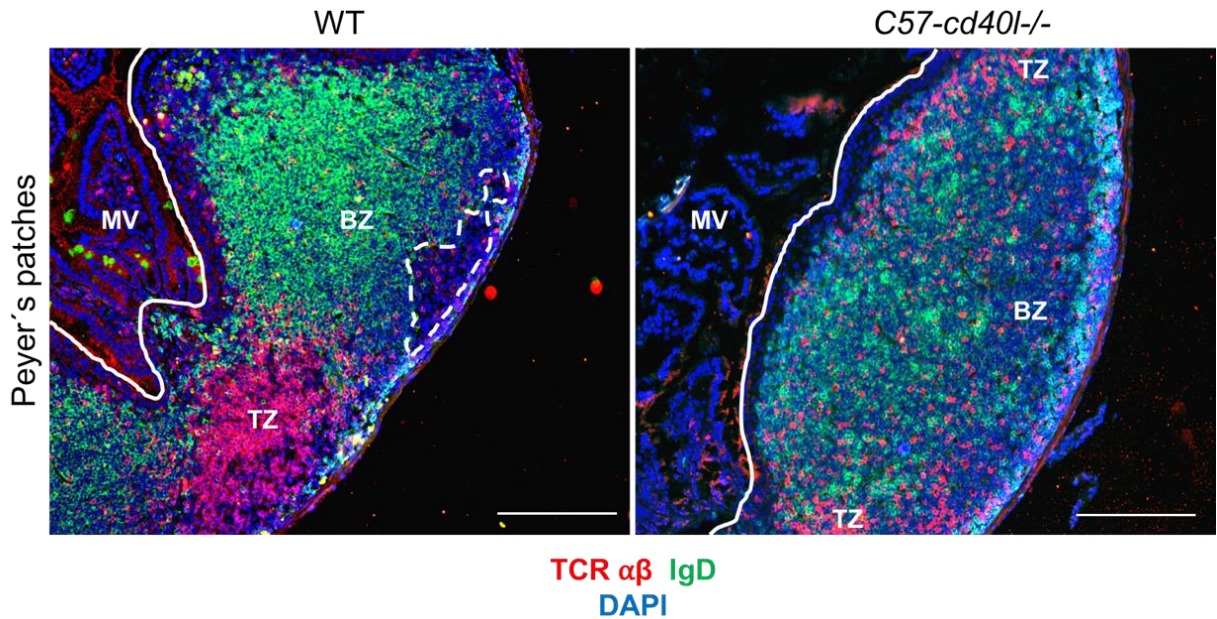


Figura 18. Distribución *in situ* e *in vivo* de Lc B y T en placas de Peyer en el estado basal en ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Tinción de LcT $\alpha\beta$ en rojo, LcB naïve en verde y DAPI en azul. Las barras blancas equivalen a 200 μ m. La línea blanca sólida delimita a la PP. BZ= zona de células B. TZ= Zona de células T. MV= microvellosidades. Imágenes representativas de dos experimentos independientes (N=2).

Para confirmar el folículo (BZ) y la zona extra folicular (TZ) en las PP en ambas cepas de ratones se realizó una tinción doble LcB B220 (rojo) y LcB naïve IgD (verde), observándose como se muestra en la Figura 19 en ambos paneles una región de color amarillo/naranja la zona folicular (BZ) y en ausencia de color doble negativo claramente delimitada la extrafolicular (TZ). En los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} el área extra folicular TZ es más pequeña (panel derecho) en comparación con la de los ratones WT (panel izquierdo).

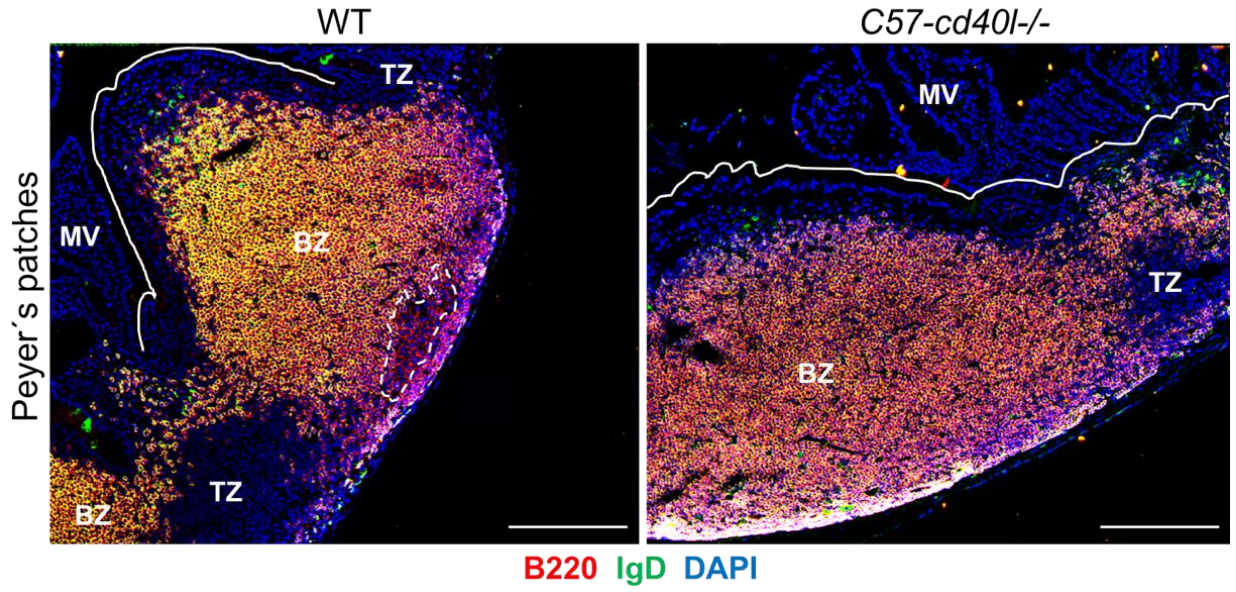


Figura 19. Distribución *in situ* e *in vivo* de LcB totales y LcB naïve en placas de Peyer en el estado basal de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Tinción de los LcB totales en rojo, LcB naïve en amarillo y DAPI en azul. Las barras blancas equivalen a 200µm. La línea blanca sólida delimita a la PP, las líneas blancas punteadas muestran el GC. BZ= zona de células B. TZ= Zona de células T. MV= microvellosidades. Imágenes representativas de dos experimentos independientes (N=2).

7.8. Caracterización morfológica, localización microscópica y cuantificación de las poblaciones de células B y de células plasmáticas de los órganos linfoides secundarios, en el estado basal en los ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}

7.8.1. El bazo

Como se ilustra en el panel A de la Figura 20, se observó que los bazos de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son significativamente más largos (cm) (P=0.0057) que los bazos de los ratones WT. La comparación entre las poblaciones de LcB del bazo entre las cepas WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} (Figura 20, panel C), reveló que son significativamente mayores en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} tanto los números totales como los porcentajes de las LcB, células CD19⁺, totales (P=0,0468) y porcentaje (P=0.045), LcB naïve, LcB IgD⁺IgM⁺, totales (P=0.0455) y porcentaje (P=0.0279) y LcB IgA-positivas, totales (P= 0.0308) y porcentaje (P=0,0054).

Mientras que como se ilustra en la Figura 20, panel B, la localización *in vivo* e *in situ* de LcB naïve del bazo (IgM⁺ verde e IgD⁺ roja) en ambas cepas de ratón es similar. En los ratones WT, CP totales (CD138⁺ en verde) y las CP IgA-positivas (CD138⁺ en verde, IgA⁺ en rojo) se observaron claramente formando grupos fuera de la BZ (flechas blancas), mientras que en los bazos de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, no se encontraron CP IgA-positivas, solo se observaron CP totales (CD138⁺ en verde) dispersas por todo el OLS.

También fueron similares entre las cepas de ratones los porcentajes y el número total de CP del bazo (Figura 20, panel D superior). En los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en comparación con los ratones WT el número total de CP IgA-positivas (P=0.0452) e IgG-positivas (P=0,000402) son significativamente menores y las CP IgM-positivas (P=0,0457) significativamente mayores (panel inferior). Dado que los LcB1 también producen anticuerpos naturales, IgA e IgG3, se analizó el número total (P=0.0194) y el porcentaje (P=0.0416) de LcB1, observándose que estos valores son significativamente mayores en los bazos de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} que en los bazos de los WT (Figura 20, panel E).

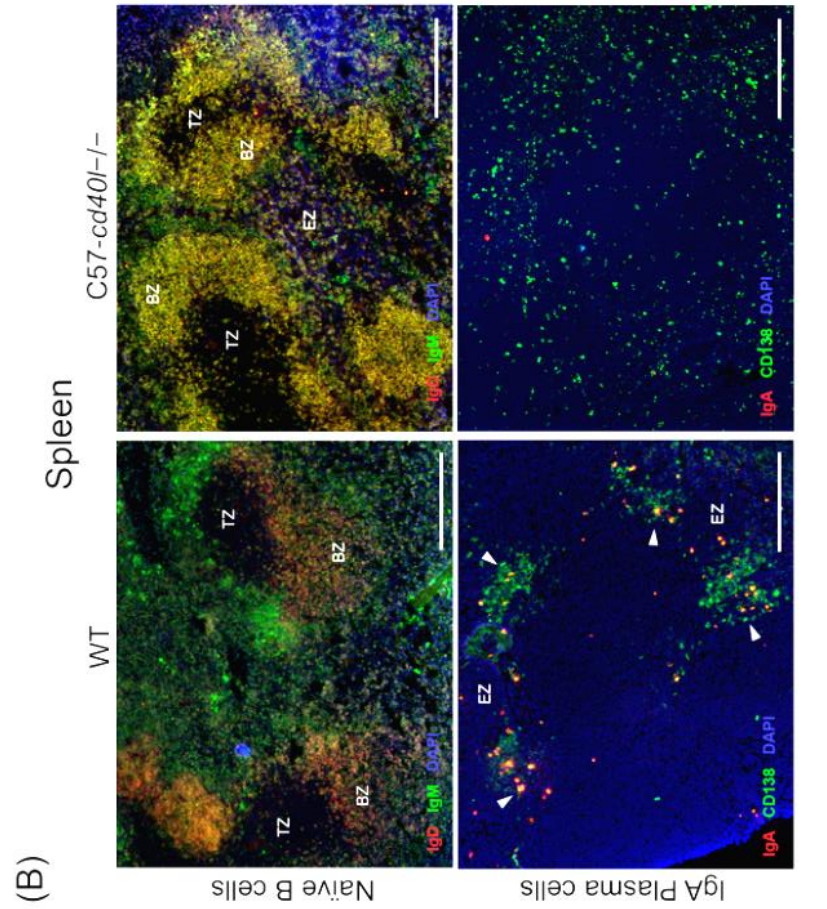
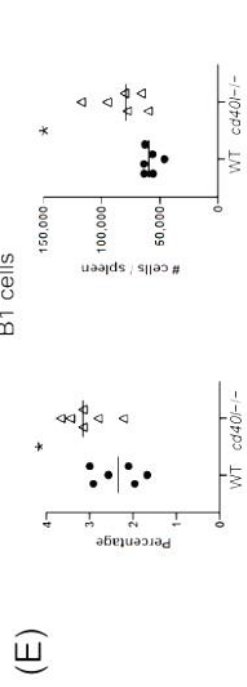
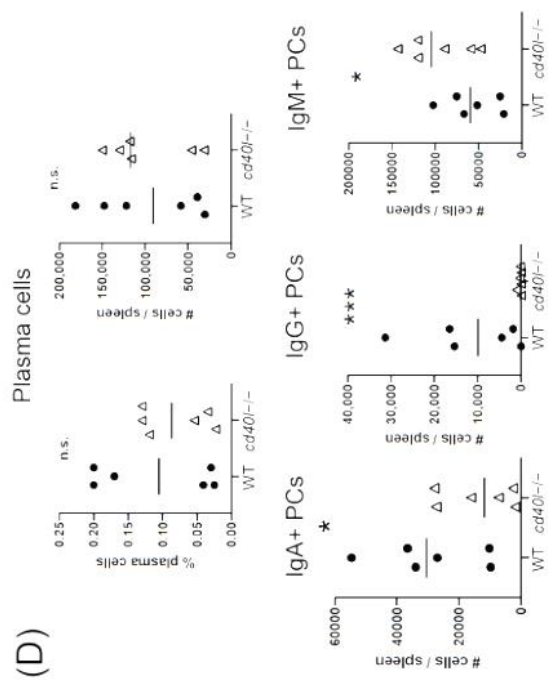
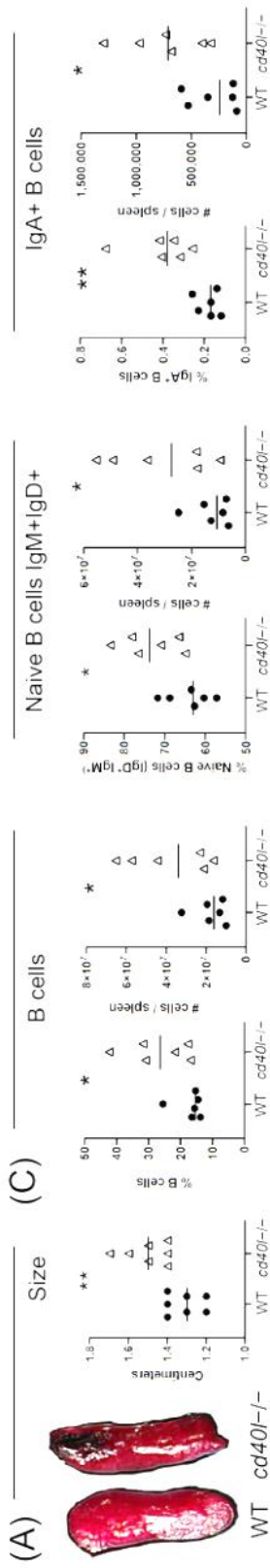


Figura 20. Descripción morfológica del bazo, localización *in vivo* e *in situ* de las LcB naïve y CPs IgA⁺ y la cuantificación de LcB, CPs totales, CP-positivas para IgM, IgA e IgG y de LcB1, en el estado basal en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT. A) Imágenes representativas de los bazos de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} y su longitud en cm. N=7 por grupo. B) Imágenes de crio cortes de microscopía de LcB naïve y CP IgA-positivas de crio cortes de bazo de ambas cepas de ratón. Las LcB naïve (IgD⁺ rojo IgM⁺ verde, amarillo combinado). Las flechas blancas indican la presencia de CPs IgA-positivas. Las barras blancas equivalen a 200µm. BZ=Zona de células B. TZ=Zona de células T. EZ=Zona extrafolicular. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes. C) Cuantificación de LcB totales (CD19⁺), LcB naïve (IgD⁺IgM⁺) y LcB IgA positivas en los bazos de ambas cepas de ratón, por medio de citometría de flujo. D) Cuantificación del total de CP positivas para IgA, IgG e IgM en los bazos de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, por medio de citometría de flujo. E) Cuantificación de LcB1 totales en el bazo de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Los datos de los gráficos de citometría de flujo son representativos de dos experimentos independientes de 3 ratones cada uno. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

7.8.2. El ganglio inguinal

Como se ilustra en la Figura 21, panel A, la longitud de ILN fue similar en ambas cepas de ratón.

La identificación y localización *in situ* e *in vivo* de LcB naïve (IgM⁺ en verde e IgD⁺ en rojo) y CP IgA- positivas (CD138⁺ en verde, IgA en rojo) en crio cortes del ILN se describen en la Figura 21, panel B, observándose en ambas cepas de ratones, en amarillo dentro de la BZ a las LcB naïve (panel superior). En el panel B inferior donde se muestran a las CP, observamos en la BZ muy pocas CPs totales en verde y ninguna CP IgA-positivas en amarillo.

El análisis de citometría de flujo de los ILN reveló que los LcB totales (CD19⁺) y las células B IgA-positivas, tanto en números totales como en sus porcentajes son similares entre ambas cepas de ratón (Figura 21, panel C, izquierda y derecha). Mientras que los porcentajes (P=0.0428) y el número (P=0.0431) de LcB naïve (células IgD⁺IgM⁺) fueron significativamente mayores en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} respecto a los ratones WT (Figura 21, panel C central). En los ILN se muestra que los porcentajes y los números de CP totales y CP IgA-positivas son similares entre ambas cepas de ratones (Figura 21, panel D superior e inferior). Por otro lado, en los ILN de ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en comparación con los ratones WT, el número total de CP IgG-positivas fue significativamente menor (P=0.00025, panel inferior central) y el número total de CP IgM-positivas fue significativamente mayor (P=0.0442, panel inferior derecho).

Como se muestra en la Figura 21, panel E, en el ILN de ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, el porcentaje de LcB1 (P=0.0063) y el número (P=0.0046) fueron significativamente mayores respecto a los ratones WT.

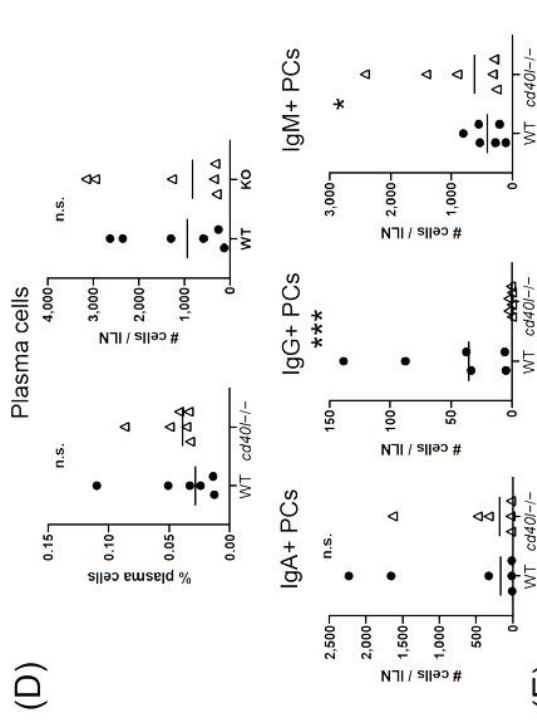
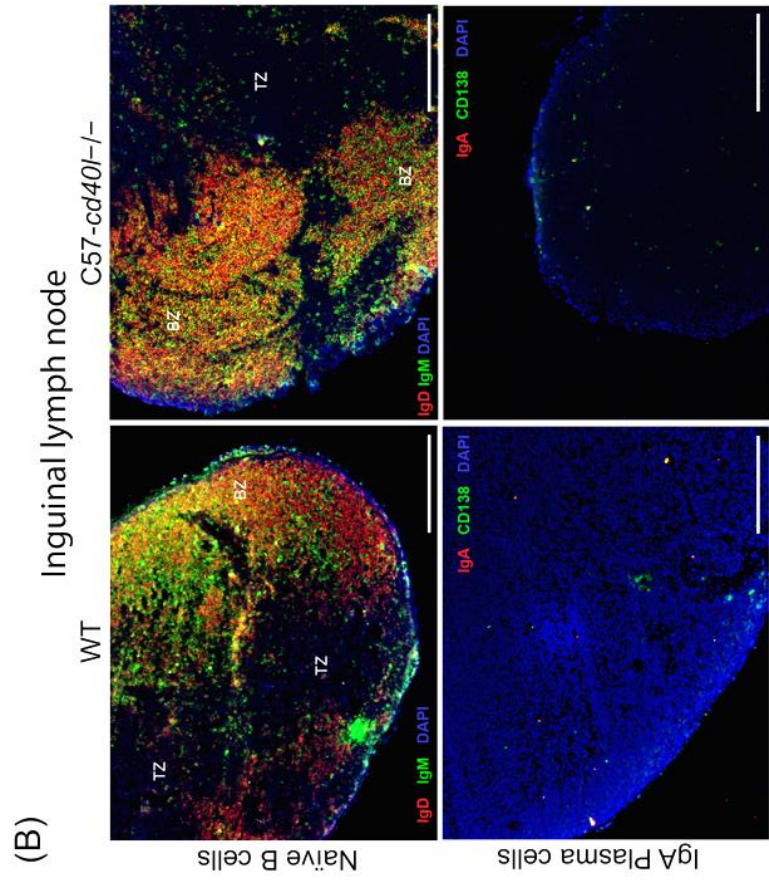
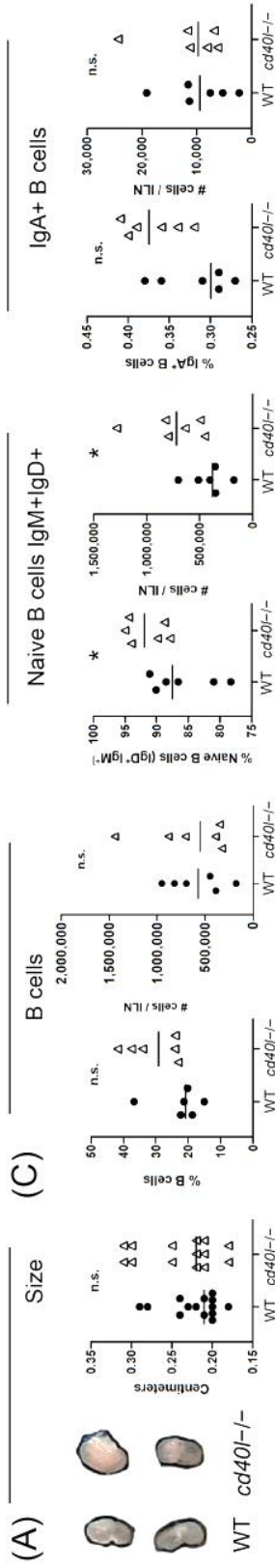


Figura 21. Descripción de los ganglios linfáticos inguinales (ILN), localización *in vivo* e *in situ* de LcB naïve y CP IgA positivas, y cuantificación de LcB, CP totales, CP positivas para IgM, IgA e IgG, y LcB1 en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT en el estado basal. A). Imágenes representativas y comparación de longitud (cm) de ILN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. N=14 por grupo. B) Identificación microscópica y localización de LcB naïve y CP IgA⁺ en crio cortes de ILN de ambas cepas de ratón. LcB B naïve (IgD⁺ rojo IgM⁺ verde, amarillo), CP totales (verde) y CP IgA-positivas (amarillo/naranja). Las barras blancas equivalen a 200µm. BZ=Zona de células B. TZ=Zona de células T. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes. C) Cuantificación de ILN y comparación entre poblaciones de LcB de ambas cepas de ratón por medio de citometría de flujo. D). Cuantificación y comparación en ILN de CP (totales, IgA-, IgG- e IgM-positivas) de ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} por citometría de flujo. E) Número total y porcentajes de LcB1 en ILN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Los datos de los gráficos de citometría de flujo son representativos de dos experimentos independientes de 3 ratones cada uno. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

7.8.3. El ganglio mesentérico

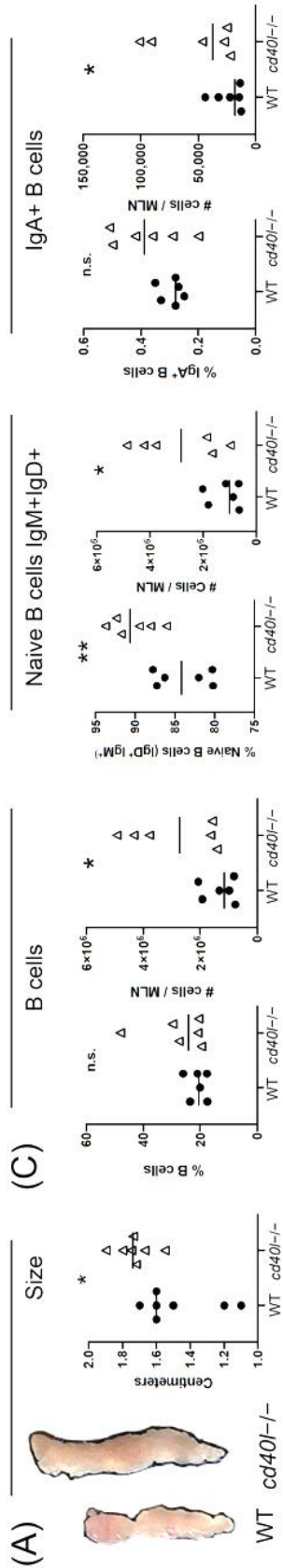
Como se muestra en la Figura 22 panel A la longitud de los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son significativamente más largos (P=0.0182) que los MLN de los ratones WT (Figura 22, panel A).

La localización y distribución *in vivo* e *in situ* de los LcB naïve (IgM⁺ verde e IgD⁺ rojo) en los MLN de los ratones WT reveló la presencia de CG (líneas de puntos blancas). No se observaron CG en el MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (Figura 22, panel B superior). Las CP totales (CD138⁺ verde) y las CP IgA-positivas (CD138⁺ verde, IgA⁺ rojo), en ambas cepas de ratón, se localizaron principalmente en la TZ (flechas blancas), aunque no se cuantificó el número de ambas CP. Los resultados sugieren que el número de estas células es mayor en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} que en los WT (Figura 22, panel B inferior).

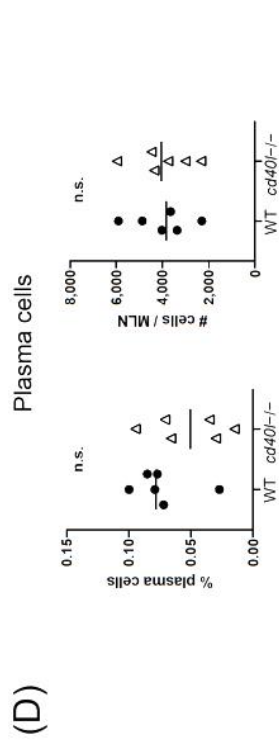
El análisis por citometría de flujo mostró que los porcentajes de LcB totales (CD19⁺) y de LcB IgA⁺ en los MLN para ambas cepas son similares. Mientras que en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} los números totales de LcB son significativamente mayores (P=0.0377), así como el número de células IgA-positivas (P=0.044), el número total (P=0.0332) y los porcentajes (P=0.0071) de LcB naïve (IgD⁺ IgM⁺), respecto a los ratones WT (Figura 22, panel C).

Como se ilustra en los gráficos de la Figura 22, panel D, en los MLN los porcentajes y los números de CP totales y de CP IgM-positivas fueron similares en ambas cepas de ratones (paneles superior e inferior derecho). En los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} el número de CP IgA-positivas fue significativamente mayor (P=0,0048) mientras que el número de CP IgG-positivas fue significativamente menor (P=0,0024) que en los MLN de los ratones WT, confirmando los resultados observados en los cortes histológicos.

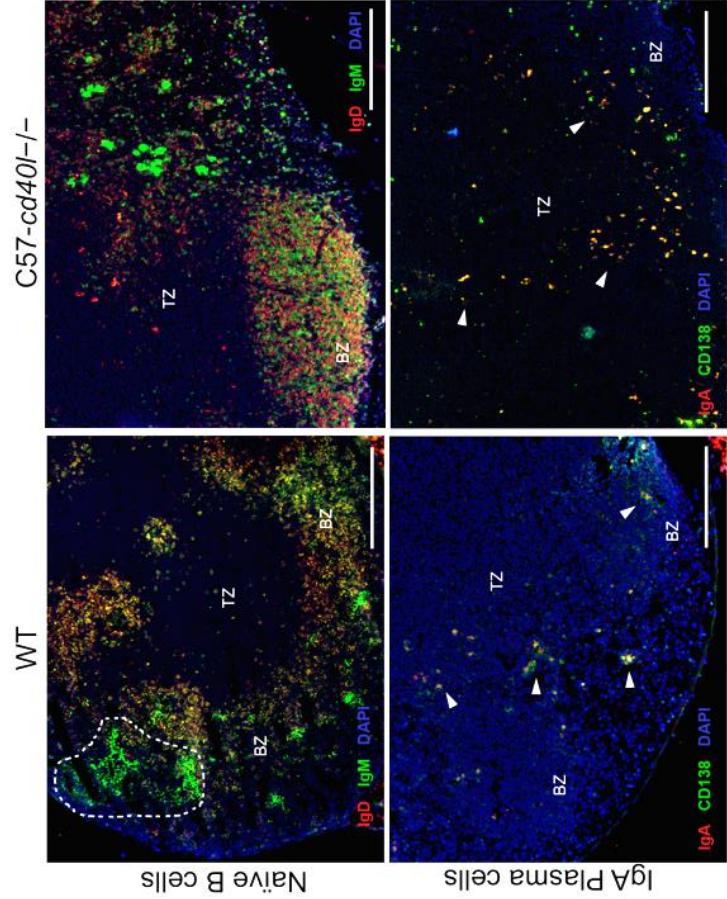
Al evaluar por citometría de flujo a los LcB1, se observó que los porcentajes (P=0,0035) y los números totales (P=0,0033) en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son significativamente mayores a los encontrados en ratones WT (Figura 22, panel E).



(D)



Mesenteric lymph node



(E)

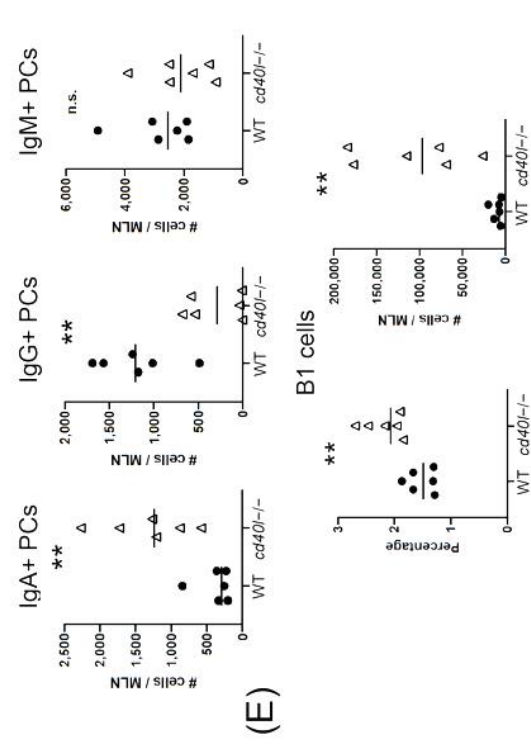


Figura 22. Descripción de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), localización *in vivo* e *in situ* de LcB naïve y CP IgA-positivas y cuantificación de LcB, CP totales, CP positivas- para IgM, IgA e IgG, y LcB1 en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT, en el estado basal. A) Imágenes representativas y comparación de la longitud (cm) del MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. N=7 por grupo. B) Identificación microscópica y localización de LcB naïve y CP IgA-positivas en crio cortes de MLN de ambas cepas de ratón. Centros germinales (líneas blancas punteadas). LcB naïve (IgD⁺IgM⁺ en amarillo), CP totales (CD138⁺ en verde) y CP IgA-positivas (CD138⁺ en verde, IgA⁺ en rojo, señaladas por flechas blancas). Las barras blancas equivalen a 200µm. BZ=Zona de células B. TZ=Zona de células T. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes. C). Cuantificación y comparación de los LcB totales (CD19⁺), LcB naïve (IgD⁺IgM⁺) y LcB IgA-positivas, entre los MLN de ambas cepas de ratones, mediante citometría de flujo. D) Cuantificación y comparación de CP (total, IgA-, IgG- e IgM) en MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, por citometría de flujo. E) Número total y porcentajes de LcB1 en el MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Los datos de los gráficos de citometría de flujo son representativos de dos experimentos independientes de 3 ratones cada uno. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. *P < 0,05, **P < 0,005. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

7.8.4. Las placas de Peyer

Al comparar las PP de ambas cepas de ratones, se observó que las PP de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son significativamente más pequeñas (P=0.0002) que las PP de ratones WT (Figura 23, panel A).

Como se muestra en la Figura 23 de los crio cortes de las PP la localización *in vivo* e *in situ* de los LcB naïve (IgM⁺ verde e IgD⁺ roja) es similar en ambas cepas de ratones. Nuevamente solo se observó la formación del CG (líneas blancas punteadas) en las PP de los ratones WT, los cuales contenían abundantes células IgM-positivas (en verde). En contraste las PP de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, no mostraron la presencia de CG, y los LcB naïve (amarillas) fueron las células más abundantes dentro del folículo (BZ). Se identificaron muy pocas células IgM-positivas (células verdes) en la TZ de las PP de ambas cepas de ratones (Figura 23 panel B superior).

Como se ilustra en la Figura 23, panel B inferior, en ambas cepas de ratones se identificó en la TZ de las PP (flechas blancas) un número muy bajo de CPs totales (CD138⁺ en verde) y CPs IgA-positivas (CD138⁺ en verde, IgA⁺ en rojo). En los crio cortes de las PP de los ratones WT (panel inferior izquierdo), se identificaron CG (delimitado por líneas punteadas) positivos para IgA (células rojas) dentro del folículo. Cabe hacer notar que en los crio cortes de las PP de los ratones WT la mayoría de las CP totales (en verde) y las CP IgA-positivas se identificaron abundantemente dentro de las MV, estructuras que no pertenecen a las PP, en contraste en las MV de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} se observaron escasas CPs IgA-positivas (en amarillo) y no se identificaron CPs totales (en verde, panel inferior derecho).

Por citometría de flujo, se observaron diferencias significativas en los porcentajes y números de LcB totales y LcB IgA-positivas entre las PP de ambas cepas de ratones (Figura 23 panel C izquierdo y derecho). El porcentaje de LcB naïve en las PP de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} es significativamente mayor (P=0.0027) que en los ratones WT (Figura 23, panel B central). En las PP de ambas cepas de ratones, los porcentajes y los números de CPs y CPs IgM-positivas fueron similares (Figura 23, panel D superior). En los

ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en comparación con los ratones WT, el número de CPs IgA-positivas es significativamente mayor (P=0.0496), mientras que el número de CPs IgG-positivas es significativamente menor (P=0.0415, Figura 23 panel inferior D).

A pesar de que los porcentajes de LcB1 de las PP es similar entre las cepas de ratones (Figura 23, panel E), el número de LcB1 en las PP de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} es significativamente mayor (P=0.0411) que en las PP de los ratones WT.

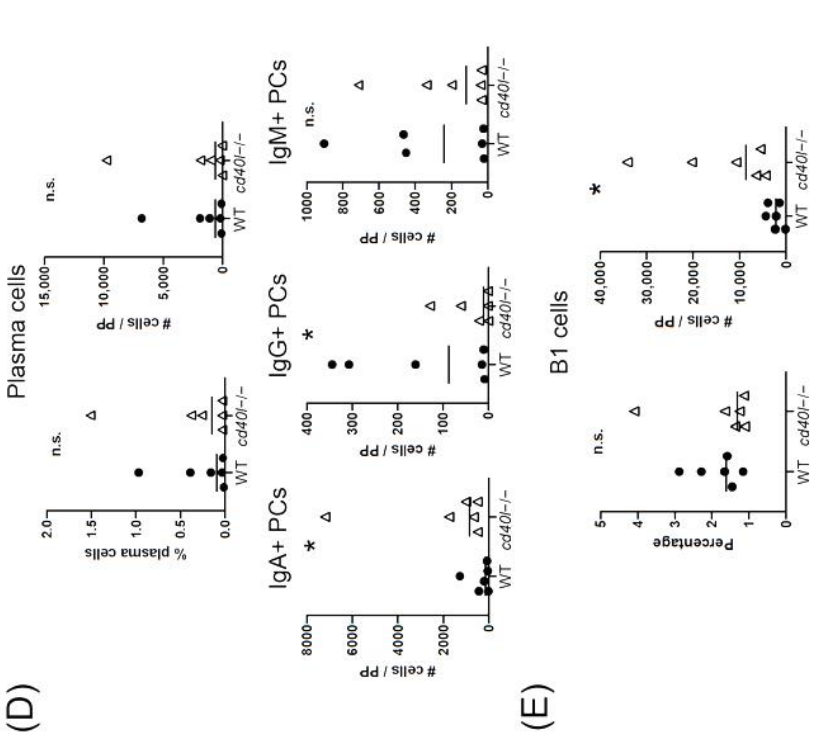
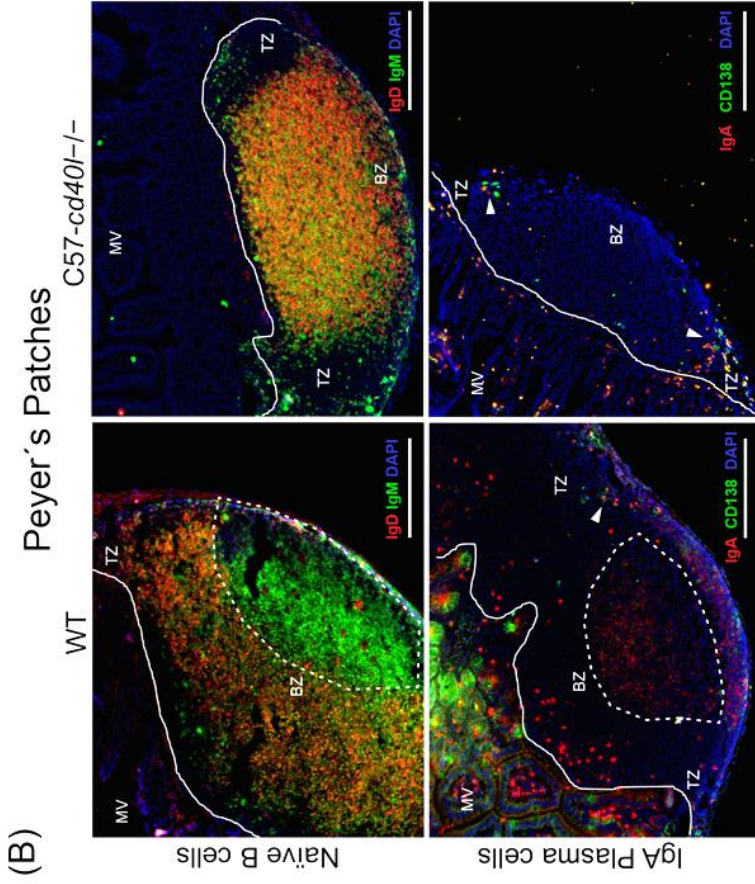
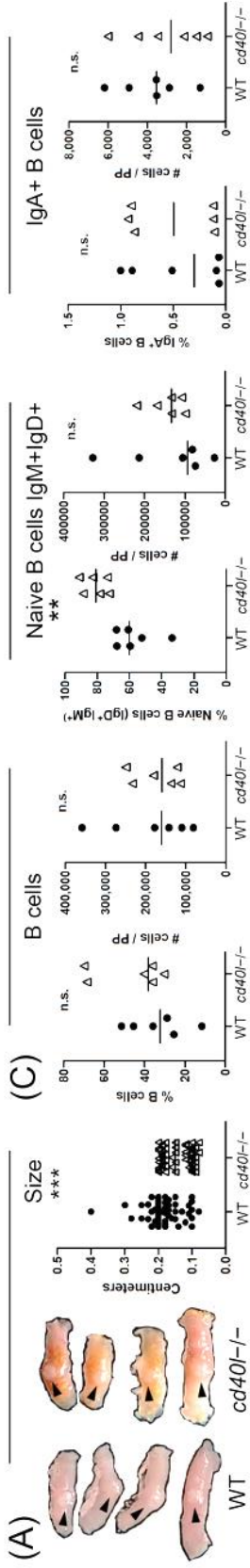


Figura 23. Descripción de las placas de Peyer, localización *in vivo* e *in situ* de LcB naïve y CPs IgA-positivas y cuantificación de LcB, CPs totales, CPs IgM-, IgA- e IgG-positivas y LcB1 en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT en el estado basal. A) Imágenes representativas y longitud de las PP de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. N=56 por grupo (7 ratones por grupo). B) Identificación microscópica y localización de LcB naïve (IgD⁺IgM⁺ en amarillo, panel superior) y CP IgA-positivas (en amarillo, panel inferior) en crio cortes de las PP de ambas cepas de ratón. Las barras blancas equivalen a 200µm. MV= microvellosidades. BZ=Zona de células B. TZ=Zona de células T. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes. C) Cuantificación y comparación de LcB totales (CD19⁺), LcB naïve (IgD⁺IgM⁺) y LcB IgA-positivas de las PP de ambas cepas de ratón, por medio de citometría de flujo. D) Cuantificación y comparación de CP (totales, IgA-, IgG- e IgM-positivas) en las PP de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, por citometría de flujo. E) Número total y porcentajes de LcB1 en las PP de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, por citometría de flujo. Los datos de los gráficos de citometría de flujo son representativos de dos experimentos independientes de 3 ratones cada uno. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.0005. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

7.9. Poblaciones de LcB y CPs en suspensiones de lavados peritoneales de ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT en el estado basal

Como se ilustra en la Figura 24 panel A, en los lavados peritoneales los porcentajes y el número de LcB totales (células CD19⁺) fueron similares para ambas cepas de animales, mientras que el número de LcB IgA-positivas (P=0.0254) de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en comparación con los ratones WT fueron significativamente menores.

El análisis microscópico de las poblaciones de LcB en las suspensiones de los lavados peritoneales de ambas cepas de ratones, mostró que las células IgA-positivas en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son menos abundantes que en las suspensiones de los ratones WT (Figura 24 panel B).

El número total de CPs (P=0.000393) y el número de CPs IgG-positivas (P=0.0457) son significativamente menores en las suspensiones de los lavados peritoneales de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, mientras que se observaron cantidades similares de CPs positivas- para IgA e IgM en ambas cepas de ratones (Figura 24, panel C).

Como se muestra en la Figura 24, panel D, en los lavados peritoneales de los C57BL6-*cd40l*^{-/-} los porcentajes (P=0.0049) y los números totales (P=0.0172) de los LcB1 fueron significativamente menores en comparación con los WT (Figura 24, panel D).

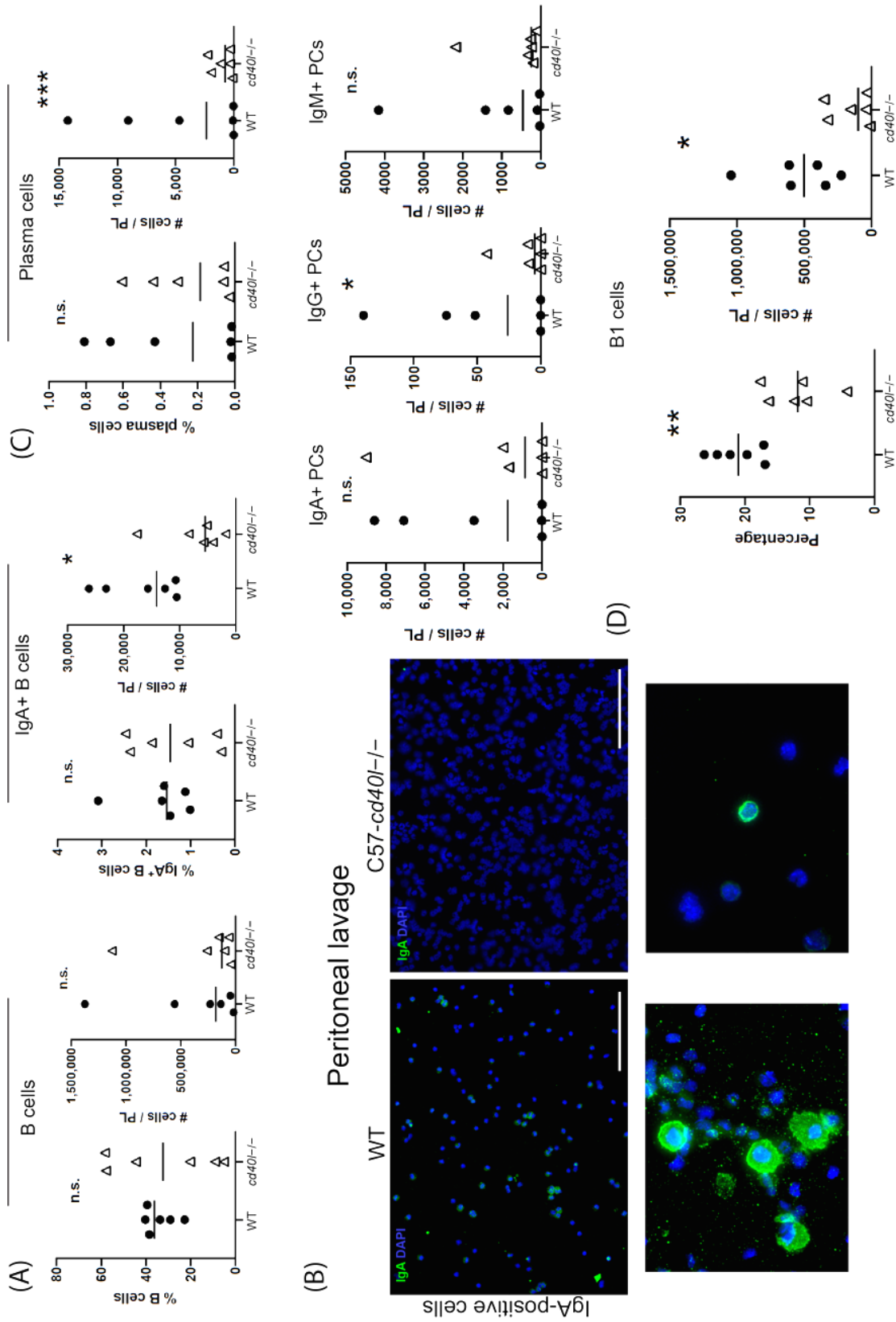


Figura 24. Cuantificación de poblaciones de LcB, CPs totales y CPs positivas para IgM, IgA e IgG e identificación de células IgA-positivas en suspensiones de lavados peritoneales de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal. A) Cuantificación y comparación de LcB totales (CD19⁺) y células B IgA-positivas en suspensiones celulares de lavados peritoneales de ambas cepas de ratón, por citometría de flujo. B) Identificación microscópica de células IgA-positivas (verde) en suspensiones de lavado peritoneal mediante cytopspin de ambas cepas de ratón. El panel inferior ilustra la ampliación del panel superior que indica a las células IgA-positivas (verde). Las barras blancas equivalen a 200µm. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes. C) Cuantificación y comparación de CPs (totales, IgA-, IgG- e IgM) en suspensiones de lavados peritoneales de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}, por citometría de flujo. D) Número total y porcentajes de LcB1 en suspensiones de lavados peritoneales de ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y WT. Los datos de los gráficos de citometría de flujo son representativos de dos experimentos independientes de 3 ratones cada uno. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

7.10. Evaluación del receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) en la superficie de los LcB totales en el estado basal de los ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}

En los LcB la citocina TGFβ es una de las principales citocinas involucradas en la polarización hacia el cambio de isotipo a IgA. Se analizó y comparó por citometría de flujo la expresión en la superficie de los LcB de los OLS asociados (MLN) y no asociados (bazo) al intestino, la expresión del receptor 1 de TGFβ (TGFβR1) en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y ratones WT.

Como se muestra en la Figura 25 en ambas cepas de ratón los LcB del bazo mostraron una expresión similar del TGFβR1, en contraste la expresión en la superficie de los LcB de los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} fue significativamente mayor (P=0.047) en comparación con los ratones WT.

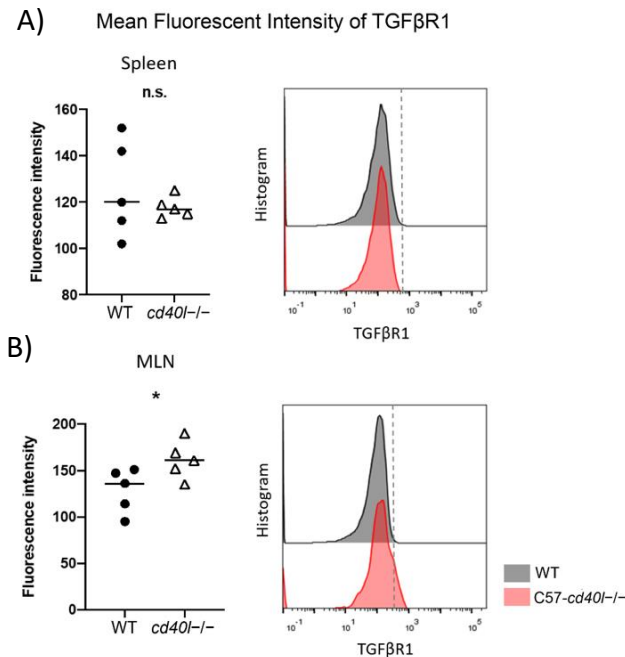


Figura 25. Intensidad media de fluorescencia (MFI) del receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta (TGFβR1) sobre la membrana de los LcB del bazo y de los LcB del MLN de en el estado basal de los ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. A) Comparación de la intensidad media de fluorescencia del TGFβR1 en los LcB del bazo de los ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. El histograma de la derecha ilustra la intensidad media de fluorescencia del TGFβR1 en la superficie de los LcB de ratones WT (gris) y C57BL6-*cd40l*^{-/-} (rojo). B) Comparación de la intensidad media de fluorescencia de TGFβR1 en la superficie de los LcB del MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. El histograma de la derecha ilustra la intensidad media de fluorescencia de TGFβR1 en la superficie de los LcB de los ratones WT (gris) y C57BL6-*cd40l*^{-/-} (rojo). Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes (N=5) por medio de citometría de flujo. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. *P<0.05. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

7.11. Evaluación del receptor CD40 sobre la superficie de los LcB en el estado basal de los ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}

Se reportó que la expresión de CD40 y CD40L es regulada entre sí en ciertos procesos biológicos (Chatzigeorgiou A, et al., 2009). Considerando lo anterior, las células de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} pueden presentar alteraciones en la expresión de del receptor CD40, que como se mencionó previamente es una molécula constitutiva sobre los LcB, la que participa en varios procesos biológicos. Al analizar la expresión de este receptor en las LcB del bazo y de los MLN observamos una expresión similar en ambas cepas de ratones (Figura 26).

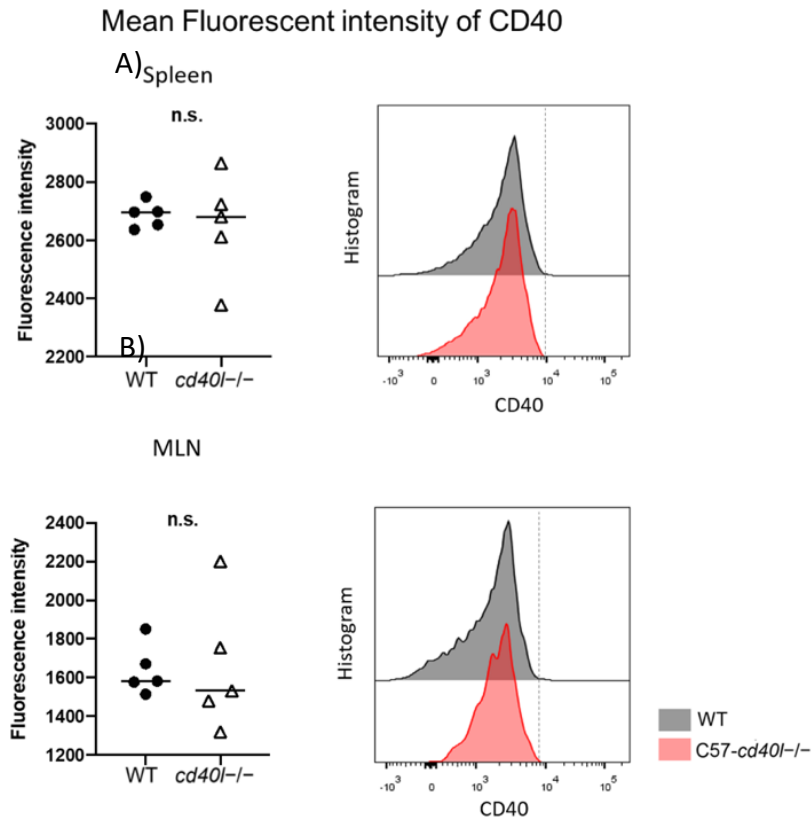


Figura 26. Intensidad media de fluorescencia (MFI) del receptor CD40 en la membrana de los LcB de bazo y de los LcB del MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40*^{-/-} en el estado basal. A) Comparación de la intensidad media de fluorescencia de CD40 en los LcB del bazo de ratones WT y C57BL6-*cd40*^{-/-}. B) Intensidad media de fluorescencia de CD40 en los LcB de los MLN de ratones WT y C57BL6-*cd40*^{-/-}. El histograma de la derecha ilustra la intensidad media de fluorescencia de CD40 en la superficie de los LcB de ratones WT (gris) y C57BL6-*cd40*^{-/-} (rojo). Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes (N=5) por medio de citometría de flujo. La significancia estadística se calculó utilizando una prueba t de Student para datos no pareados. Los puntos negros representan ratones WT y los triángulos blancos representan ratones C57BL6-*cd40*^{-/-}. Intervalo de confianza=95%. n.s.=no significativo.

8. DISCUSIÓN

En el año 2014 se describió la caracterización genética y clínica de los pacientes con síndrome de HIGM en países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Perú y México), revelando que la mayoría de los pacientes con HIGM (95%) presenta mutaciones en el gen *cd40l*. Los pacientes con HIGM en Latinoamérica también presentan infecciones recurrentes de vías respiratorias e intestinales en donde la bacteria *Salmonella* spp, el hongo *Microsporidium* spp y los protozoarios *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Isospora belli*, son los microorganismos más comunes asociados con diarrea crónica en estos pacientes (Cabral-Marques et al., 2014).

Nuestro grupo de trabajo describió por primera vez que los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal presentan concentraciones significativamente mayores de IgA fecales en comparación con los ratones WT (Bernal-Reynaga R, et al., 2013). Esto cobra gran relevancia ya que la IgA es la inmunoglobulina más abundante en el tracto intestinal y en las mucosas, la cual proviene de la estimulación de los LcB por antígenos microbianos en respuestas TD y TI, diferenciándose a una CP.

Las IgA producidas en el intestino de los ratones regula la topografía microbiana, la composición, el crecimiento, así como la invasión bacteriana e incluso modula las funciones inmunometabólicas del hospedero y sus respuestas inmunitarias (Chen K, et al., 2020). Por lo tanto, para comprender los eventos que originan la observación de mayores concentraciones de IgA fecal en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal, el objetivo del presente estudio fue determinar la morfología de los OLS asociados al intestino (MLN y las PP) y no asociados al intestino (bazo e ILN) en ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y la prevalencia de varias poblaciones de los LcB y las CPs (CP totales y CP-IgA, -IgG e -IgM positivas para) en estos OLS.

Para ello analizamos y comparamos varios aspectos entre los ratones WT y los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Determinamos la distribución y la frecuencia de células IgA-positivas en las microvellosidades del intestino (LcB IgA-positivas y CP IgA-positivas), observándose

que la distribución y la frecuencia de células IgA-positivas es similar en ambas cepas de ratones, lo que sugiere que estas poblaciones se comportan de manera similar en ambas cepas de ratones (MacPherson AJ, et al., 2000). Indicando que la cantidad de IgA en el intestino no se ve afectada por la ausencia de CD40L, confirmando que la mayor producción de IgA en el intestino es producida en reacciones TI dirigida principalmente por la microbiota (Hara S, et al., 2019), lo que nos llevó a caracterizar a las células productoras de IgA en los OLS.

Al analizar a los OLS asociados y no asociados al intestino en el estado basal en los ratones WT, describimos que exclusivamente se observan la formación de CGs en OLS asociados al intestino, esto podría deberse al hecho de la estimulación continua de antígenos en los OLS intestinales por parte de microorganismos y antígenos provenientes de los alimentos, como está bien establecido (Forchielli ML y Walker WA, 2005; Van den Broeck W et al., 2006; Suzuki K et al., 2010; Stebegg M, et al., 2018). Se ha descrito que después de la inmunización oral de ratones WT con ovoalbúmina-toxina del cólera (antígeno TD), las células IgA-positivas están ausentes o presentes en cantidades bajas dentro del bazo y otros ganglios linfáticos no asociados con el intestino (Weiberg D, et al., 2018), lo que también indica que la estimulación de los antígenos en los OLS está influenciada por el sitio de inmunización (Drayson MT, 1986). Por el contrario, en las PP y el MLN de los ratones WT se observó una mayor frecuencia de células IgA-positivas dentro del CG, conocidas como células IgA del CG, como se ha demostrado en reacciones dirigidas por antígenos experimentales (Mora JR y von Andrian UH, 2008). Se observaron células IgA-positivas dentro de los OLS asociados con el intestino de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} incluso en ausencia de CGs, lo que reveló una abundancia y localización diferencial de las células IgA-positivas, estas fueron más abundantes y estaban ubicadas dentro del folículo (BZ) en los MLN, y menos abundantes y ubicados dentro de la TZ en las PP, indicándonos que en los OLS de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} las respuestas inmunes están polarizadas a respuestas TI debido a la ausencia de respuestas TD y la formación del CG. En general, nuestros resultados sugieren que, en ratones no inmunizados, la formación del CG y la producción de células IgA-positivas se limitan principalmente a los

OLS asociados al intestino que están constantemente expuestos a antígenos microbianos y alimentarios (Suzuki K et al., 2010).

Al identificar células IgA-positivas dentro del folículo de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} aun en ausencia de CGs, determinamos la expresión y la distribución de AID, una proteína indispensable para el CSR de los LcB. En los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} AID se localizó principalmente en la zona extrafolicular (TZ) sugiriendo que ocurre un CSR aun en la ausencia de reacciones TD y de la formación del CG (Chi X, et al., 2020). En contraste en los MLN de los ratones WT la expresión de AID principalmente se encuentra dentro de los folículos (BZ) mostrando que el CSR se está llevando a cabo dentro de estos OLS como se ha reportado anteriormente (Yu K, 2022).

Los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} al no expresar CD40L esto pone de manifiesto que la interacción CD40-CD40L en la sinapsis inmunológica entre los LcB y T es indispensable para la formación del CG y probablemente afecte otras funciones de los LcT y LcB (Mesin L, et al., 2016) por lo tanto analizamos la distribución *in situ* e *in vivo* de los LcT en los OLS asociados al intestino (MLN y PP). En los MLN de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} en comparación con los ratones WT se observó una menor intensidad de fluorescencia de LcT $\alpha\beta$ en la TZ y una menor frecuencia dentro del folículo (BZ), esto podrá deberse a la deficiencia en la interacción entre el LcB y el LcT, donde el CD40L induce tanto la proliferación como la diferenciación del LcT, lo que permite que estos migren dentro del folículo y cooperen con los LcB (Gasteiger G, et al., 2016). Sin embargo, al analizar la intensidad de fluorescencia de los LcT CD8 en las dos cepas de ratones no se observaron diferencias entre los ratones, esto podría deberse a que el CD40L se expresa principalmente el LcT CD4 afectando sus procesos de proliferación y diferenciación (Elgueta R, et al., 2009).

Como se describió previamente los GC están ausentes en los OLS (bazo y en el ILN) en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, (Renshaw BR, et al., 1994) nosotros corroboramos esta observación, pero describimos por primera vez que los CG también están ausentes en los OLS asociados al intestino (PP y MLN). También los ratones C57BL6 deficientes en el

receptor CD40 carecen de CG en los OLS asociados al intestino (PP y MLN) (Castigli E, et al., 1994; Bergqvist P, et al., 2006). Confirmando una vez más que la interacción entre CD40 (en las células B) y CD40L (en las células T activadas) es esencial para la formación del GC (Kawabe T et al., 1994; Renshaw BR, et al., 1994; Takemori T, et al., 2014).

La caracterización de células IgA-positivas *in vivo* e *in situ* en los OLS no intestinales y asociados al intestino en ambas cepas de ratones no inmunizados, reveló que en los OLS no asociados al intestino (bazo e ILN) se identificaron células IgA-positivas dentro del TZ, con una frecuencia muy baja. Por el contrario, se observó un número elevado y similar de células IgA-positivas en las MV del intestino delgado de ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Confirmando que la mayor parte de la producción intestinal de IgA no requiere la interacción CD40-CD40L, la formación del GC y esta producción surge de una manera TI (Fleming A, et al., 2022).

Se ha documentado que los anticuerpos producidos en los OLS no asociados al intestino son principalmente secretados en el suero (Mebius RE y Kraal G, 2005), con base en esto se observó que el número total de CP IgM-positivas fue significativamente mayor en los OLS no asociados al intestino en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, en contraste con los ratones WT, así como y las CP IgA-positivas fueron significativamente menores; corroborando que los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} están produciendo un número mayor o igual de anticuerpos IgM séricos y un menor número de anticuerpos IgA (Bernal-Reynaga R, et al., 2013) similar a las concentraciones séricas reportadas en los pacientes con HIGM (Meng X, et al., 2018).

En las suspensiones de los OLS asociados al intestino de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, en comparación con los WT las CPs IgA-positivas son significativamente mayores, estos resultados sugieren que las IgA producidas en altas concentraciones en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (Bernal-Reynaga R, et al., 2013) provienen de CP IgA-positivas presentes en los OLS asociados al intestino. En estos mismos ratones la frecuencia de CP IgG-positivas en todos los OLS evaluados es significativamente menor en comparación con

los WT, lo que confirma que la mayoría de las respuestas de IgG provienen de reacciones del CG (Elsner RA y Shlomchik MJ, 2020).

También se ha reportado que la IgG (total) en las heces de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} es significativamente más baja que en los ratones WT (Bernal-Reynaga R, et al., 2013) cabe mencionar que las concentraciones de Igs en heces de pacientes con HIGM hasta el momento se desconocen, pero sugerimos que las concentraciones de IgA e IgG se comportaran como las observadas en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Corroborando las observaciones anteriores en las suspensiones de los OLS de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} identificamos un número significativamente menor de CP IgG-positivas, confirmando que la mayoría de las respuestas de IgG tienen lugar en el CG principalmente contra antígenos TD (Elsner RA y Shlomchik MJ, 2020).

Nuestros resultados en conjunto confirman el papel de las PP y el MLN como sitios inductores de la respuesta inmune en el intestino, cuyos rasgos característicos son iniciar la producción preferencial de IgA en este sitio anatómico (Koch MA, et al., 2016; Weiberg D, et al., 2018). Los anticuerpos IgA juegan un papel fundamental en la neutralización, eliminación y regulación de los patógenos y los microorganismos en el intestino (Gommerman JL, et al., 2014; Takeuchi T y Ohno H, 2021). Es probable que esta respuesta específica de IgA contra patógenos intestinales pueda ser dirigida contra antígenos TI con el fin de entrenar al sistema inmune intestinal y posteriormente realizar vacunas.

En efecto se pueden sensibilizar a los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, se ha reportado que estos ratones inmunizados con *C. rodentium*, un patógeno murino causante de diarrea, producen anticuerpos séricos de los isotipos IgM e IgG, en particular IgG2b, específicos contra este patógeno y estos anticuerpos tuvieron efecto bactericida mediada por complemento (López-Saucedo C, et al., 2015). Por lo tanto, es posible que las IgM e IgG intestinales también tengan un efecto bactericida contra los patógenos bacterianos intestinales en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} (López-Saucedo C, et al., 2015), sin embargo, se debe demostrar la presencia de Igs de los isotipos IgM e IgG2b en las heces de estos ratones.

Los LcB1 son una fuente importante de anticuerpos naturales IgA e IgM, los cuales son secretados en las mucosas tanto intestinales como pulmonares (Suzuki K et al., 2010; Baumgarth N, 2011; Prieto JMB y Felipe MJB, 2017). Hasta el momento esta población de LcB1 no se han caracterizado en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Los LcB1 de lavados peritoneales de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son significativamente menores en comparación con los ratones WT. Sin embargo, las poblaciones de LcB1 en todos los OLS analizados (asociados y no asociados al intestino) son significativamente más abundantes en ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} que en los ratones WT.

Estos resultados sugieren que en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} la población de LcB1 que normalmente en el estado basal se encuentra en la cavidad peritoneal y pleural (Prieto JMB y Felipe MJB, 2017; Beller A, et al., 2020; Kaminski DA, y Stavnezer J, 2006) está migrando a sitios efectores inmunitarios, en todo el organismo del ratón, para contribuir en la producción de anticuerpos (Hardy RR y Hayakawa K, 2005). Por lo tanto, es posible que CP derivadas de esta población de LcB también estén contribuyendo a las altas concentraciones de CP IgA-positivas en los OLS asociados al intestino. Se ha demostrado que los LcB1 y sus anticuerpos juegan un papel importante en la protección contra la enfermedad de neumococos en ratones (causada por *Streptococcus pneumoniae*), los animales que carecen de los LcB1 no pudieron sobrevivir a las infecciones por neumococos y esto puede deberse al hecho de que no se producen IgM e IgA naturales, especialmente contra el polisacárido capsular neumocócico serotipo 3 (PPS)-3, un antígeno no proteico que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias (Dasu T, et al., 2009; Rodríguez-Zhurbenko N, et al., 2019). Además, la población de LcB1 humanas genera anticuerpos contra los polisacáridos de *S. pneumoniae* y el polisacárido VI de *Salmonella typhi* (agente causal de la fiebre tifoidea), lo que indica el papel importante de los LcB1 en las respuestas inmunitarias de mucosas en animales y humanos. (Suzuki K, et al., 2010; Marshall JL, et al., 2012; Rodríguez-Zhurbenko N, et al., 2019). Los miembros de la superfamilia TGFβ contribuyen a la maduración y la diferenciación de los LcB, promoviendo particularmente la producción de IgA (Tamayo E, et al., 2018; Takeuchi T y Ohno H, 2021). La expresión del receptor 1 de TGFβ (TGFβR1)

sobre la superficie de los LcB del bazo de ambas cepas de ratones, fue similar, por el contrario, la expresión del TGF β R1 en los LcB del MLN, es significativamente mayor en los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Estas observaciones en su conjunto indican que en el MLN hay un microambiente que promueve la polarización hacia la producción de IgA en el intestino de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. Esto se ha demostrado en el microambiente de los OLS asociados al intestino después de un reto antigénico en ratones WT (Beller A, et al., 2020)

Además se ha demostrado *in vitro* que los LcBZM y los LcB1 son más propensos que los LcB2 a hacer CSR hacia IgA, sin embargo se encontraron diferencias en la señalización para el CSR hacia IgA entre los LcBZM y los LcB1, ya que IL-4 e IL-5 (citocinas conocidas por promover el CSR hacia IgA) suprimen el CSR a IgA en los LcB1, estos resultados sugieren que los diferentes tipos de LcB poseen mecanismos distintos para la producción de ciertos isotipos de Ig y que en especial los LcBZM y LcB1 son más efectivos en producir de IgA en reacciones TI que los LcB2 (Kaminski DA, y Stavnezer J, 2006).

Por primera vez se han caracterizado las respuestas inmunes y las poblaciones de LcB en los OLS asociados al intestino en el estado basal de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. La mayor abundancia de las células IgA-positivas, CP IgA-positivas y de los LcB1, así como la mayor expresión del receptor TGF β R1 en la superficie de los LcB demuestran que las concentraciones elevadas de IgA en las heces provienen principalmente de células productoras de IgA de reacciones TI en los OLS asociados al intestino de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}. El entendimiento de estos procesos permitirá dirigir las respuestas específicas contra bacterias de las mucosas en estos ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} y humanos con HIGM.

9. CONCLUSION

La mayoría de los pacientes con HIGM (95%) tienen mutaciones del gen *cd40l*, los pacientes se caracterizan por concentraciones séricas de IgM más altas/similares y más bajas de IgE e IgA y por la ausencia de IgE y de CG en los OLS. Los pacientes con HIGM presentan infecciones recurrentes de vías respiratorias e intestinales cuyo tratamiento hasta el momento es la transferencia de Igs pero que desafortunadamente no mejora en todos los casos a estos pacientes.

El ratón C57BL6-*cd40l*^{-/-} tiene concentraciones de inmunoglobulinas séricas similares a los observados en los pacientes con HIGM y sus OLS también carecen de CG, por lo que este ratón es un modelo para estudiar las respuestas inmunes que probablemente se llevan a cabo en los pacientes con HIGM. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} tienen anticuerpos en heces IgG disminuidos e IgA más elevados en comparación con los ratones WT, estos datos se desconocen en los pacientes de HIGM. Por otro lado, hemos demostrado que los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-} son capaces de producir anticuerpos específicos contra un patógeno murino y eliminarlo en una respuesta mediada por complemento. Por todo lo anterior es importante caracterizar la respuesta en mucosas de los ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}, en el presente trabajo establecimos que los OLS asociados al intestino producen células productoras de IgA y que existe un microambiente que favorece este tipo de respuesta en reacciones TI. También mostramos que los LcB1 migran a los OLS donde podrán inducir la producción de anticuerpos naturales específicos (IgM e IgA). Nuestro conocimiento recientemente adquirido ayudará al desarrollo de tratamientos específicos para la eliminación de patógenos intestinales y de vías respiratorias en pacientes con HIGM, al sensibilizar estos órganos con antígenos TI de estos patógenos.

10. PERSPECTIVAS

1. Analizar y comparar la expresión de TACI en la membrana de los LcB (receptor de BAFF y APRIL) provenientes de los OLS asociados al intestino en ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal.
2. Analizar y comparar *in situ* la expresión de TGF β , BAFF y APRIL en los OLS asociados al intestino en ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal.
3. Determinar los niveles en suero y en heces de IgG total e IgG2b en ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-} en el estado basal.
4. Realizar un ensayo de migración de LcB entre los OLS de ratones WT y ratones C57BL6-*cd40l*^{-/-}.
5. Analizar la expresión de IgE en los OLS de los ratones WT y C57BL6-*cd40l*^{-/-}.

11. REFERENCIAS

1. Ager A. (2017) High Endothelial Venules and Other Blood Vessels: Critical Regulators of Lymphoid Organ Development and Function. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2017.00045. PMID: 28217126; PMCID: PMC5289948.
2. Barnett BE, Ciocca ML, Goenka R, Barnett LG, Wu J, Laufer TM, Burkhardt JK, Cancro MP, Reiner SL. (2012) Asymmetric B cell division in the germinal center reaction. *Science.* doi: 10.1126/science.1213495. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22174128; PMCID: PMC3282111.
3. Baumgarth N. (2011) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* doi: 10.1038/nri2901.
4. Beller, A., Kruglov, A., Durek, P., von Goetze, V., Werner, K., Heinz, G. A., Ninnemann, J., Lehmann, K., Maier, R., Hoffmann, U., Riedel, R., Heiking, K., Zimmermann, J., Siegmund, B., Mashreghi, M. F., Radbruch, A., & Chang, H. D. (2020). Specific microbiota enhances intestinal IgA levels by inducing TGF- β in T follicular helper cells of Peyer's patches in mice. *European journal of immunology*, 50(6), 783–794. <https://doi.org/10.1002/eji.201948474>
5. Bergqvist P, Gärdby E, Stensson A, Bemark M, Lycke NY. (2006) Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J Immunol.* doi: 10.4049/jimmunol.177.11.7772.
6. Bernal-Reynaga R, Thompson-Bonilla R, Lopez-Saucedo C, Pech-Armenta M, Estrada-Parra S, Estrada-Garcia T. (2013) C57-CD40 ligand deficient mice: a potential model for enterotoxigenic *Escherichia coli* (H10407) colonization. *Vet Immunol Immunopathol.* doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.025.
7. Bernier-Latmani J, Petrova TV. (2017) Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* doi: 10.1038/nrgastro.2017.79. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28655884.

8. Buettner M, Bode U. (2012) Lymph node dissection—understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol*. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04602.x. PMID: 22861359; PMCID: PMC3444996.
9. Cabral-Marques O, Klaver S, Schimke LF, Ascendino ÉH, Khan TA, Pereira PV, et al. (2014) First report of the Hyper-IgM syndrome Registry of the Latin American Society for Immunodeficiencies: novel mutations, unique infections, and outcomes. *J Clin Immunol*. doi: 10.1007/s10875-013-9980-4
10. Castigli, E., Alt, F. W., Davidson, L., Bottaro, A., Mizoguchi, E., Bhan, A. K., & Geha, R. S. (1994). CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12135–12139. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12135>.
11. Castro-Dopico T, Clatworthy MR. (2019) IgG and Fcγ Receptors in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front Immunol*. doi: 10.3389/fimmu.2019.00805.
12. Cerutti A. (2008) The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. doi: 10.1038/nri2322.
13. Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. (2009) CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors*. doi: 10.1002/biof.62. PMID: 19904719.
14. Chen K, Magri G, Grasset EK, Cerutti A. (2020) Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nat Rev Immunol*. doi: 10.1038/s41577-019-0261-1. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32015473.
15. Chen K, Magri G, Grasset EK, Cerutti A. (2020) Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nat Rev Immunol*. doi: 10.1038/s41577-019-0261-1.
16. Chi X, Li Y, Qiu X. (2020) V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology*. doi: 10.1111/imm.13176. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32031242; PMCID: PMC7341547.

17. Cyster JG, Allen CDC. (2019) B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.016. PMID: 31002794; PMCID: PMC6538279.
18. D'Souza L, Bhattacharya D. (2019) Plasma cells: You are what you eat. *Immunol Rev*. doi: 10.1111/imr.12732. PMID: 30874356; PMCID: PMC6422051.
19. Dasu, T., Sindhava, V., Clarke, S. H., & Bondada, S. (2009). CD19 signaling is impaired in murine peritoneal and splenic B-1 B lymphocytes. *Molecular immunology*, 46(13), 2655–2665. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.015>.
20. Davies EG, Thrasher AJ. (2010) Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br J Haematol*. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08077.x.
21. Drayson MT. (1986) The entry of lymphocytes into stimulated lymph nodes. The site of selection of alloantigen-specific cells. *Transplantation*. doi: 10.1097/00007890-198606000-00016.
22. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. (2009) Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
23. Elsner RA, Shlomchik MJ. (2020) Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.006. PMID: 33326765; PMCID: PMC7748291.
24. Feng Y, Wang Y, Zhang S, Haneef K, Liu W. (2020) Structural and immunogenomic insights into B-cell receptor activation. *J Genet Genomics*. doi: 10.1016/j.jgg.2019.12.003. Epub 2020 Jan 9. PMID: 32111437.
25. Fleming, A., Castro-Dopico, T., & Clatworthy, M. R. (2022). B cell class switching in intestinal immunity in health and disease. *Scandinavian journal of immunology*, 95(2), e13139. <https://doi.org/10.1111/sji.13139>.
26. Forchielli ML, Walker WA. (2005) The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*. doi: 10.1079/bjn20041356. PMID: 15877894.

27. França TT, Barreiros LA, Al-Ramadi BK, Ochs HD, Cabral-Marques O, Condino-Neto A. (2019) CD40 ligand deficiency: treatment strategies and novel therapeutic perspectives. *Expert Rev Clin Immunol.* doi: 10.1080/1744666X.2019.1573674. Epub 2019 Feb 18. PMID: 30681380.
28. Gasteiger, G., Ataide, M., & Kastenmüller, W. (2016). Lymph node - an organ for T-cell activation and pathogen defense. *Immunological reviews*, 271(1), 200–220. <https://doi.org/10.1111/imr.12399>
29. Gommerman JL, Rojas OL, Fritz JH.(2014) Re-thinking the functions of IgA(+) plasma cells. *Gut Microbes.* doi: 10.4161/19490976.2014.969977. PMID: 25483334; PMCID: PMC4615259.
30. Graf R, Seagal J, Otipoby KL, Lam KP, Ayoub S, Zhang B, Sander S, Chu VT, Rajewsky K. (2019) BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science.* doi: 10.1126/science.aau8475. PMID: 30765568.
31. Gutzeit, C., Chen, K., & Cerutti, A. (2018). The enigmatic function of IgD: some answers at last. *European journal of immunology*, 48(7), 1101–1113. <https://doi.org/10.1002/eji.201646547>
32. Hara S, Sasaki T, Satoh-Takayama N, Kanaya T, Kato T, Takikawa Y, Takahashi M, Tachibana N, Kim KS, Surh CD, Ohno H. (2019) Dietary Antigens Induce Germinal Center Responses in Peyer’s Patches and Antigen-Specific IgA Production. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2019.02432. PMID: 31681315; PMCID: PMC6803481.
33. Hardy RR, Hayakawa K. (2005) Development of B cells producing natural autoantibodies to thymocytes and senescent erythrocytes. *Springer Semin Immunopathol.* doi: 10.1007/s00281-004-0183-1.
34. He JS, Narayanan S, Subramaniam S, Ho WQ, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. (2015) Biology of IgE production: IgE cell differentiation and the memory of IgE responses. *Curr Top Microbiol Immunol.* doi: 10.1007/978-3-319-13725-4_1. PMID: 25553792.

35. Jung C, Hugot JP, Barreau F. (2010) Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam.* doi: 10.4061/2010/823710. PMID: 21188221; PMCID: PMC3004000.
36. Kaminski, D. A., & Stavnezer, J. (2006). Enhanced IgA class switching in marginal zone and B1 B cells relative to follicular/B2 B cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 177(9), 6025–6029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6025>
37. Karimi MH, Pourfathollah AA. (2012) CD40 and tolerance induction. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* PMID: 22427471.
38. Karnell JL, Rieder SA, Ettinger R, Kolbeck R. (2018) Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019 Feb 15;141:92-103. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.005. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30552917.
39. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, et al. (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* doi: 10.1016/1074-7613(94)90095-7.
40. Klein U, Dalla-Favera R. (2008) Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* doi: 10.1038/nri2217. PMID: 18097447.
41. Koch, M. A., Reiner, G. L., Lugo, K. A., Kreuk, L. S., Stanbery, A. G., Ansaldo, E., Seher, T. D., Ludington, W. B., & Barton, G. M. (2016). Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell*, 165(4), 827–841. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.055>.
42. Korniluk A, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V. (2014) Multifunctional CD40L: pro- and anti-neoplastic activity. *Tumour Biol.* doi: 10.1007/s13277-014-2407-x. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25117071; PMCID: PMC4213374.
43. Kroese FG, Butcher EC, Stall AM, Lalor PA, Adams S, Herzenberg LA (1989). Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing

- precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol.*;1(1):75-84. doi: 10.1093/intimm/1.1.75.
44. Lamm ME, Nedrud JG, Kaetzel CS, Mazanec MB.(1995) IgA and mucosal defense. *APMIS*. doi: 10.1111/j.1699-0463.1995.tb01101.x. PMID: 7612253.
45. Leberman DA, Edmiston JS. (1999) The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.* doi: 10.1016/s1286-4579(99)00254-3.
46. Lopez-Saucedo C, Bernal-Reynaga R, Zayas-Jahuey J, Galindo-Gomez S, Shibayama M, Garcia-Galvez C, et al. (2015) CD40 Ligand Deficient C57BL/6 Mouse Is a Potential Surrogate Model of Human X-Linked Hyper IgM (X-HIGM) Syndrome for Characterizing Immune Responses against Pathogens. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/679850.
47. Loskog A, Tötterman TH. (2007) CD40L - a multipotent molecule for tumor therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. doi: 10.2174/187153007780059432. PMID: 17346201.
48. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zúñiga E, Cook MC, Vinuesa CG. (2003) Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev.* doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00058.x. PMID: 12846803.
49. MacPherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM.(2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*. doi: 10.1126/science.288.5474.2222. PMID: 10864873.
50. Marshall JL, Flores-Langarica A, Kingsley RA, Hitchcock JR, Ross EA, López-Macías C, et al. (2012) The capsular polysaccharide Vi from *Salmonella typhi* is a B1b antigen. *J Immunol*. doi: 10.4049/jimmunol.1103166.
51. Martín-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. (2009) Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol*. doi: 10.1007/978-3-540-71029-5_2. PMID: 19031020.

52. Matsuuchi L, Gold MR. (2001) New views of BCR structure and organization. *Curr Opin Immunol*. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00215-6. PMID: 11406357.
53. Mebius RE, Kraal G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. doi: 10.1038/nri1669. PMID: 16056254.
54. Meng X, Yang B, Suen WC. (2018) Prospects for modulating the CD40/CD40L pathway in the therapy of the hyper-IgM syndrome. *Innate Immun*. doi: 10.1177/1753425917739681. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29132233; PMCID: PMC6830763.
55. Mesin L, Ersching J, Victora GD. (2016) Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001. PMID: 27653600; PMCID: PMC5123673.
56. Methot SP, Di Noia JM.(2017) Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv Immunol*. doi: 10.1016/bs.ai.2016.11.002. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28215280.
57. Meyer-Bahlburg A. (2015) B-1 cells as a source of IgA. *Ann N Y Acad Sci*. doi: 10.1111/nyas.12801. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26062045.
58. Moazzami B, Yazdani R, Azizi G, Kiaei F, Tafakori M, Modaresi M, et al. (2019) Respiratory Complications in Patients with Hyper IgM Syndrome. *J Clin Immunol*. doi: 10.1007/s10875-019-00650-3.
59. Mora JR, von Andrian UH. (2008) Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/mi.2007.14.
60. Pabst O, Wahl B, Bernhardt G, Hammerschmidt SI. (2009) Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *J Mol Med (Berl)*. doi: 10.1007/s00109-009-0502-z. Epub 2009 Aug 1. PMID: 19649572.
61. Palm AE, Kleinau S. (2021) Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *J Autoimmun*. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102627. Epub 2021 Feb 25. PMID: 33640662.

62. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.046. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23465663.
63. Prieto JMB, Felipe MJB. (2017) Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* doi: 10.1016/j.cimid.2017.08.002. Epub 2017 Aug 26. PMID: 28916000.
64. Reap EA, Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA.(1993) Conventional B cells, not B-1 cells, are responsible for producing autoantibodies in lpr mice. *J Exp Med.* doi: 10.1084/jem.177.1.69. PMID: 8418209; PMCID: PMC2190870.
65. Renshaw BR, Fanslow WC 3rd, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, et al. (1994) Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med.* doi: 10.1084/jem.180.5.1889.
66. Rodriguez-Zhurbenko N, Quach TD, Hopkins TJ, Rothstein TL, Hernandez AM. (2019) Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2019.00483.
67. Savage HP, Baumgarth N. (2015) Characteristics of natural antibody-secreting cells. *Ann N Y Acad Sci.* doi: 10.1111/nyas.12799. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26104151; PMCID: PMC4679694.
68. Schroeder HW Jr, Cavacini L.(2010) Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PMID: 20176268; PMCID: PMC3670108.
69. Shaikh H, Vargas JG, Mokhtari Z, Jarick KJ, Ulbrich M, Mosca JP, Viera EA, Graf C, Le DD, Heinze KG, Büttner-Herold M, Rosenwald A, Pezoldt J, Huehn J, Beilhack A. (2021) Mesenteric Lymph Node Transplantation in Mice to Study Immune Responses of the Gastrointestinal Tract. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2021.689896. PMID: 34381447; PMCID: PMC8352558.
70. Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. (2018) Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2018.02469.

71. Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace WW, et al. (2010) The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity*. doi: 10.1016/j.immuni.2010.07.003.
72. Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., & Rajewsky, K. (2014). Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *European journal of immunology*, 44(5), 1258–1264. <https://doi.org/10.1002/eji.201343716>.
73. Takeuchi, T., & Ohno, H. (2021). Reciprocal regulation of IgA and the gut microbiota: a key mutualism in the intestine. *International immunology*, 33(12), 781–786. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab049>.
74. Tamayo E, Alvarez P, Merino R. (2018) TGF β Superfamily Members as Regulators of B Cell Development and Function-Implications for Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms19123928.
75. Tolar P, Pierce SK. (2022) Unveiling the B cell receptor structure. *Science*. doi: 10.1126/science.add8065. Epub 2022 Aug 18. PMID: 35981020.
76. Treanor B. (2012) B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03564.x. PMID: 22269039; PMCID: PMC3372753.
77. Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. (2006) Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods*. doi: 10.1016/j.jim.2006.01.022. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16624319.
78. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. (2022) *Annu Rev Immunol*. doi: 10.1146/annurev-immunol-120419-022408. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35113731.
79. Weiberg D, Basic M, Smoczek M, Bode U, Bornemann M, Buettner M. (2018) Participation of the spleen in the IgA immune response in the gut. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0205247.
80. Willard-Mack CL. (2006) Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol*. doi: 10.1080/01926230600867727. PMID: 17067937.

81. Yazdani R, Fekrvand S, Shahkarami S, Azizi G, Moazzami B, Abolhassani H, et al. (2019). The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management. *Clin Immunol.* doi: 10.1016/j.clim.2018.11.007.
82. Yu K. (2022). AID function in somatic hypermutation and class switch recombination. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 54(6), 759–766. <https://doi.org/10.3724/abbs.2022070>
83. Zuo T, Gautam A, Wesemann DR. (2019) Affinity war: forging immunoglobulin repertoires. *Curr Opin Immunol.* doi: 10.1016/j.coi.2018.12.002. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30690255; PMCID: PMC6511487.

ARTÍCULOS

1. **Hernandez-Cazares, F.**, Maqueda-Alfaro, R. A., Lopez-Saucedo, C., Martinez-Barnette, J., Yam-Puc, J. C., Estrada-Parra, S., Flores-Romo, L., & Estrada-Garcia, T. (2023). Elevated levels of enteric IgA in an unimmunised mouse model of Hyper IgM syndrome derived from gut-associated secondary lymph organs even in the absence of germinal centres. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1172021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1172021>
2. Orozco-Uribe, M., Maqueda-Alfaro, R., **Hernández-Cázares, F.**, Saucedo-Campos, A. D., Donis-Maturano, L., Calderón-Amador, J., Flores-Romo, L., Ortiz-Navarrete, V., & Hernández-Hernández, J. M. (2023). Early appearance of functional plasma cells (CD138+CD98+) in non-immunized neonate mice. *Immunology letters*, 259, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.05.004>
3. Martínez-Vargas, I. U., Sánchez-Bello, M. E., Miguel-Rodríguez, C. E., **Hernández-Cázares, F.**, Santos-Argumedo, L., & Talamás-Rohana, P. (2023). Myo1f has an essential role in $\gamma\delta$ T intraepithelial lymphocyte adhesion and migration. *Frontiers in immunology*, 14, 1041079. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1041079>
4. Moran-Garcia, N., Lopez-Saucedo, C., Becerra, A., Meza-Segura, M., **Hernandez-Cazares, F.**, Guerrero-Baez, J., Galindo-Gómez, S., Tsutsumi, V., Schnoor, M., Méndez-Tenorio, A., Nataro, J. P., & Estrada-Garcia, T. (2022). A Novel Adult Murine Model of Typical Enteroaggregative Escherichia coli Infection Reveals Microbiota Dysbiosis, Mucus Secretion, and AAF/II-Mediated Expression and Localization of β -Catenin and Expression of MUC1 in Ileum. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 885191. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.885191>

5. Celestino-Montes, A., Hernández-Martínez, S., Rodríguez, M. H., Cázares-Raga, F. E., Vázquez-Calzada, C., Lagunes-Guillén, A., Chávez-Munguía, B., Rubio-Miranda, J. Á., **Hernández-Cázares, F. J.**, Cortés-Martínez, L., & Hernández-Hernández, F. C. (2021). Development of the indirect flight muscles of *Aedes aegypti*, a main arbovirus vector. *BMC developmental biology*, 21(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12861-021-00242-8>

6. Maqueda-Alfaro, R. A., Marcial-Juárez, E., Calderón-Amador, J., García-Cordero, J., Orozco-Uribe, M., **Hernández-Cázares, F.**, Medina-Pérez, U., Sánchez-Torres, L. E., Flores-Langarica, A., Cedillo-Barrón, L., Yam-Puc, J. C., & Flores-Romo, L. (2021). Robust Plasma Cell Response to Skin-Inoculated Dengue Virus in Mice. *Journal of immunology research*, 2021, 5511841. <https://doi.org/10.1155/2021/5511841>