



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Caracterización y comparación de las poblaciones de células B del bazo y de las placas de Peyer en ratones C57BL/6 y C57BL/6 cd40l^{-/-} antes y después de la inoculación oral con Escherichia coli enteroagregativa”.

TESIS

Que presenta

ANGEL PARRA ACUÑA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Estrada García

Ciudad de México

Noviembre 2023

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología por el apoyo en forma de la beca 802234 para la realización de este proyecto.

A la Dra. Teresa Estrada por la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Además, de la experiencia, los consejos y el apoyo en la escritura y realización de este proyecto.

A la Dra. Catalina por su apoyo y recomendaciones para la realización de las técnicas utilizadas en este proyecto, así como del conocimiento aportado a este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: a David, por las pláticas motivaciones y los consejos no solo científicos sino también personales; a Fernanda, por los momentos divertidos que hacían más amenos los días de trabajo; a Felipe, por toda su ayuda y experiencia en la realización de este proyecto, y Nuria, por los buenos momentos, aunque pocos, durante mi estancia.

Dedicatorias

A mi esposa Edith por estar siempre a mi lado, en las buenas y en las malas, ya que este logro es en parte de ella, por su inalcanzable apoyo y soporte durante estos 2 años de Maestría.

A mis padres, Dionisio y Beatriz, por todo el aliento e insistencia para continuar mi carrera profesional, sin su apoyo a lo largo de los años no estaría aquí.

A mis mininos, Tyron y Kuro, que, aunque no puede hablar, siempre han sido un alivio y confort en los momentos difíciles.

Índice

Agradecimientos	1
Dedicatorias.....	2
Resumen	5
Introducción	6
Síndrome Hiper IgM (HIGM)	6
Ratón C57/BL6 deficiente del ligando de CD40L (<i>cd40l^{-/-}</i>)	7
El ligando de CD40 (CD40L) y CD40	10
Producción de Anticuerpos	11
Las Células B	11
Los órganos linfoides secundarios (OLS)	14
Bazo	14
Las placas de Peyer	16
El Centro Germinal	17
El cambio de Isotipo.....	19
La inmunoglobulina A (IgA)	21
Citocinas y receptores implicados en la producción de IgA T independiente	24
<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	25
Planteamiento del Problema y Justificación	28
Hipótesis	30
Objetivos	30
Materiales y Métodos	31
Animales.....	31
Infección con EAEC 042.....	31
Mantenimiento y muestreo de los ratones post-infección	32
Evaluación de la colonización.....	33
Obtención y procesamiento de órganos de los ratones	33
Citometría de flujo	33
Análisis Estadístico.....	35
Resultados.....	36

Peso relativo y colonización de los ratones C57BL/6 y cd40l-/- con la dosis infectiva de 5x10⁹ UFC de EAEC	36
Evaluación en el estado basal y tras la inoculación de EAEC de las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo.....	38
Evaluación en el estado basal y tras la inoculación de EAEC de las poblaciones de células B y células plasmáticas en las PP	42
Comparación entre las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo y la placa de Peyer del ratón cd40l-/- en comparación con el ratón silvestre	46
Discusión	49
Conclusión.....	57
Perspectivas.....	58

Resumen

Los individuos con los síndromes de Hiper IgM (HIGM), en comparación con los sujetos sanos, se caracterizan por presentar concentraciones séricas bajas de las inmunoglobulinas (Igs) IgG, IgA, ausencia de IgE y concentraciones de IgM similares o mayores. Se ha estimado que la prevalencia del HIGM es de 1:1,000,000 de nacimientos, en promedio estos pacientes mueren antes de los 25 años y el 65-70% de los casos presentan mutaciones en el gen del ligando de CD40 (CD40L). Estos pacientes cursan desde edades tempranas con infecciones respiratorias e intestinales causadas por patógenos convencionales u oportunistas, las cuales son difíciles de eliminar y se convierten en infecciones crónicas. El tratamiento del síndrome de HIGM incluye la transferencia Igs y antibióticos para eliminar estos patógenos. El ratón C57BL/6 deficiente del CD40L (*cd40^{-/-}*) se ha utilizado como un modelo subrogado del HIGM, estos ratones se caracterizan por presentar bajas concentraciones de Igs séricas (IgG, e IgA, ausencia de IgE), concentraciones bajas y elevadas de IgG e IgA en heces, respectivamente y por la ausencia de centros germinales en todos los órganos linfoides secundarios (OLS). Por lo que en el presente trabajo se inocularon oralmente ratones C57BL/6 y *cd40^{-/-}* con una dosis de 5×10^9 UFC de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), el segundo agente causal de diarrea aguda en infantes en México. Se evaluaron antes y después de la inoculación en dos OLS, las placas de Peyer (PP) y en el bazo, las células plasmáticas (CP) (CD138⁺) y las células B: totales (CD19⁺), naïves (IgD⁺ IgM⁺), activadas (IgD⁻ IgM⁺), doble negativas (IgD⁻ IgM⁻) e IgA positivas (IgA⁺). La comparación entre las poblaciones de las PP y del bazo de los ratones *cd40^{-/-}* antes y después de 8 días post-inoculación: en las PP se observó solo un incremento en el porcentaje de las células IgA⁺ y las CP, esto sugiere que las respuestas en este OLS intestinal son rápidas ante antígenos inoculados oralmente, ya que esta comparación en el bazo nos permitió observar respuestas contra estas bacterias pero en tiempos más tardíos ya que pudimos observar una disminución del porcentaje de células B naïves, un incremento en el porcentaje y el número de las B dobles negativas, en el porcentaje de B totales y activadas y en el número de CP, sugiriendo que los antígenos intestinales tardan más tiempo en llegar al bazo. Nuestros resultados también sugieren que las respuestas del ratón *cd40^{-/-}* en las PP están polarizadas hacia respuestas de IgA, ya que también se observó un incremento en células IgA⁺ en estos ratones en comparación con los silvestres, en línea con lo ya descrito previamente de una mayor concentración en heces de esta inmunoglobulina en los ratones *cd40^{-/-}*.

Introducción

Síndrome Hiper IgM (HIGM)

El síndrome de hiper IgM (HIGM) se describió por primera vez en 1961 por Rosen y colaboradores. La primera mutación ligada a esta enfermedad fue descrita en 1992 en el gen que codifica para el ligando de CD40 (CD40L) y la cual se ha identificado en el 65 al 70% de los casos (Yazdani *et al.*, 2019). Los individuos con este síndrome se caracterizan por tener concentraciones séricas bajas de las inmunoglobulinas IgG e IgA y la ausencia de IgE, mientras que la concentración de IgM se encuentra de manera normal o incrementada (Fan *et al.*, 2022; Yazdani *et al.*, 2019; de la Morena *et al.*, 2017). Hasta la fecha además de las mutaciones en el gen de CD40L se han descrito mutaciones en otros genes en algunos pacientes con HIGM: *cd40*, *nemo*, *ikba*, *nkfb1*, *aicda* y genes asociados a la reparación del DNA (Fan *et al.*, 2022, Yazdani *et al.*, 2019, Gernez *et al.*, 2018). Los pacientes con el HIGM tienen una predisposición a presentar infecciones intestinales y de vías respiratorias recurrentes y prolongadas causadas por patógenos comunes (*Salmonella*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Staphylococcus pneumoniae*) o microorganismos oportunistas (*Pneumocystis carinii* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Fan *et al.*, 2022, Yazdani *et al.*, 2019, Gernez *et al.*, 2018; Agarwal *et al.*, 2013). También se ha reportado que el 80% de los pacientes con mutaciones en CD40L presentan alguna enfermedad hepática a partir de los 20 años de vida (hepatitis, colangitis esclerosante y carcinoma hepatocelular) (Shah *et al.*, 2013).

La prevalencia del HIGM varía alrededor del mundo acorde con las diferentes etnias. En Estados Unidos la prevalencia reportada, entre 1984 y 1993, fue de aproximadamente 1 en 1,000,000 de nacimientos. Se estima que la mutación en el gen que codifica para CD40L se presenta en 2:1,000,000 en hombres, indicando su asociación ligada al cromosoma X (Yazdani *et al.*, 2019). En seis

países de Latinoamérica (Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Perú y México) se reportó que el 94.5% de los casos de HIGM están asociados a mutaciones del gen *cd40l*, además de que se describieron infecciones crónicas intestinales por patógenos como *Salmonella* spp, *Microsporidium* spp, *Criptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Isospora belli* (Cabral-Marques *et al.*, 2014). Se ha estimado que el HIGM representa del 0.3-2.9% de todos los casos de inmunodeficiencias primarias en el mundo. La sobrevivencia de estos pacientes es del 20% a los 25 años y solo el 20% de estos alcanzan los 40 años (Fan *et al.*, 2022, Yazdani *et al.*, 2019, de la Morena *et al.*, 2017).

El tratamiento más común para los pacientes con HIGM es la terapia de remplazo de inmunoglobulinas aunado a la terapia antimicrobiana. Actualmente se han desarrollado otros tratamientos complementarios al tratamiento común como la administración de G-CSF (factor de estimulación de colonias de granulocitos), puesto que estos pacientes presentan neutropenia y los agonistas del CD40. Además, hay nuevos como el trasplante de células troncales hematopoyéticas y la terapia génica (Fan *et al.*, 2022, Yazdani *et al.*, 2019, Gernez *et al.*, 2018; de la Morena *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 1995). Adicionalmente, a los pacientes con HIGM se les recomienda el monitoreo de la función hepática (a través de la medición de las enzimas hepáticas) (Yazdani *et al.*, 2019).

Ratón C57/BL6 deficiente del ligando de CD40L (*cd40l*^{-/-})

En 1994 dos grupos de trabajo de forma independiente, Xu *et al.* y Renshaw *et al.*, desarrollaron ratones deficientes para el CD40L. Estos ratones simulan el HIGM ligado a cromosoma X en humanos, el cual se caracteriza por tener concentraciones normales o elevados de IgM séricas, pero un bajo nivel de IgG e IgA séricas, así como una ausencia de la IgE sérica. El ratón desarrollado por el grupo de Renshaw se obtuvo por recombinación homóloga, donde se realizó la delección del exón 3 y 4 del gen *cd40l* que se localiza en el

cromosoma X. En estos ratones se observaron niveles normales de IgM y bajos de IgA e IgG, así como niveles indetectables de IgE en suero, en comparación al ratón silvestre. Se usaron dos antígenos diferentes para evaluar la respuesta de anticuerpos en los ratones *cd40^{-/-}*. Los antígenos T dependientes (TD), son antígenos que requieren la cooperación de las células T, que se caracterizan por ser proteínas, polipéptidos, complejos hapteno transportador y antígenos que contienen epítomos muy variados. Los antígenos T independientes (TI), son antígenos que pueden estimular a las células B para producir anticuerpos sin la participación de las células T, estos son generalmente polisacáridos que contienen epítomos repetidos o lipopolisacáridos (LPS) como los presentes en microorganismos Gram negativos (Cruse *et al.*, 2004). Los ratones *cd40^{-/-}* al ser retados con un antígeno TD (TBP-KLH) no produjeron anticuerpos IgA e IgG específicos contra este antígeno y no presentaron centros germinales (CG) en el ganglio inguinal y el bazo. Mientras que al ser retados con un antígeno TI (DNP-Ficoll) se observó la producción tanto de IgA como de IgG para este antígeno. (Renshaw *et al.*, 1994).

Estos ratones han sido ampliamente utilizados para realizar estudios de la importancia de la interacción CD40-CD40L sobre diversos procesos biológicos (Grasset *et al.*, 2020), así como para el estudio de patógenos que infectan a humanos con los que normalmente no pueden ser infectados los ratones silvestres (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013), o para demostrar cómo se incrementa la susceptibilidad a la infección con patógenos intestinales murinos como *Citrobacter rodentium* (López-Saucedo *et al.*, 2015), como sucede en los pacientes con HIGM que frecuentemente tienen infecciones gastrointestinales. Debido a la alta incidencia de enfermedades hepáticas en los pacientes con HIGM, el modelo también ha permitido explicar a qué se puede deber estas enfermedades en humanos, ya que los ratones *cd40^{-/-}* que se les ha transferido hepatocitos alogénicos son incapaces de desarrollar células T citotóxicas funcionales (Yang & Wilson, 1996). Estos autores utilizando el modelo murino de *cd40^{-/-}* demostraron que es posible restituir la completa

respuesta celular y humoral con la administración de anticuerpos contra CD40; también observaron que estas repuestas son dependientes de la expresión B7.2 cuya expresión se da en células de bazo, demostrando que la activación dependiente del CD40L de células T se lleva a cabo a través de la señalización de CD40 en las células presentadoras de antígeno, para incrementar vías coestimuladoras necesarias para estas repuestas incluyendo la vía del B7 (B7-CD28) (Yang & Wilson, 1996).

Las concentraciones séricas basales de las inmunoglobulinas IgA, e IgG en los ratones *cd40^{-/-}* adultos y en los ratones silvestres, han sido evaluadas en otros estudios (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013; López-Saucedo *et al.*, 2015), mostrando perfiles similares a los reportados por Renshaw *et al.* (1994) (Figura 1A). Además, Bernal-Reynaga y colaboradores, evaluaron también los niveles basales de IgA e IgG en las heces de los ratones *cd40^{-/-}* y en los silvestres, reportando que las concentraciones de IgA son significativamente mayores en comparación con el ratón silvestre (Figura 1B), pero las de IgG son significativamente menores, sugiriendo un síndrome de hiper IgA intestinal (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013).

Por otro lado, al evaluar las respuestas séricas específicas de anticuerpos contra *C. rodentium* en estos ratones, se observó que no hay diferencias significativas en la producción de anticuerpo IgM e IgG3 entre los ratones *cd40^{-/-}* y los silvestres, mientras que las concentraciones séricas de los anticuerpos específicos de las clases IgA, IgG1, IgG2b, e IgG2c estaban significativamente disminuidas. En este estudio se demostró que estos ratones la IgG2b mantiene su actividad bactericida mediada por complemento, sugiriendo que los ratones están respondiendo a antígenos TI de *C. rodentium* (López-Saucedo *et al.*, 2015).

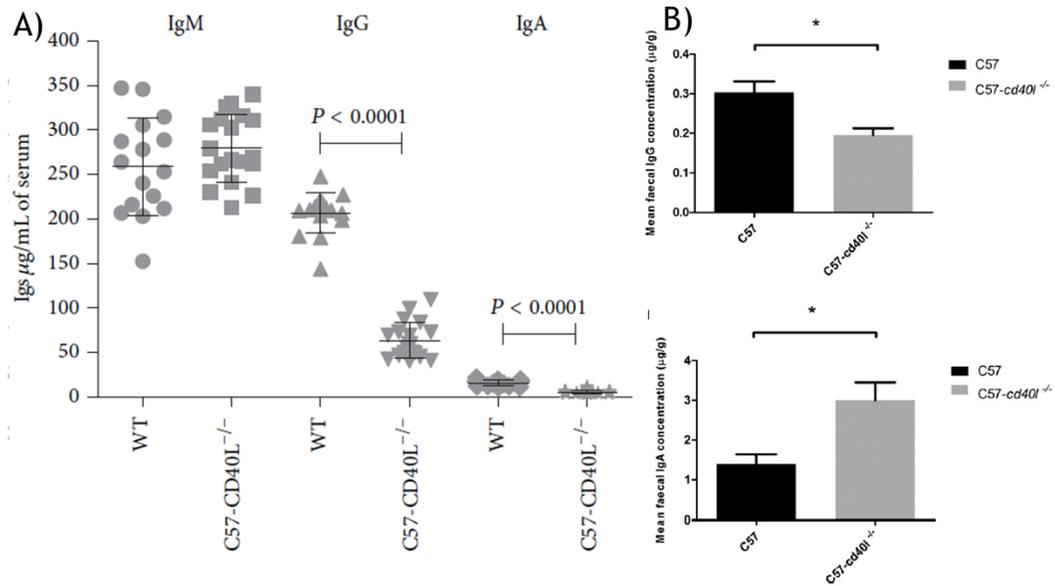


Figura 1. A) Concentración de inmunoglobulinas en suero de ratones silvestres (WT) y deficientes para CD40L (C57- *cd40l*^{-/-}). B) Concentración de IgA e IgG en heces ratones silvestres (C57) y deficientes para CD40L (C57- *cd40l*^{-/-}). Tomada de Bernal-Reynaga et al., 2013 y López-Saucedo *et al.*, 2015.

El ligando de CD40 (CD40L) y CD40

La molécula CD40L pertenece a la familia de los TNF (factor de necrosis tumoral), es una glicoproteína de 39 kilo-Daltons (kDa), y también se produce por escisión un CD40L soluble de 18 kDa. El receptor del CD40L es el CD40, el cual pertenece a la familia TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral) y es una glicoproteína de 45 a 50 kDa (Noelle *et al.*, 1992; Chatzigeorgiou *et al.* 2009; Schlom *et al.*, 2013; Laman *et al.*, 2017).

La molécula CD40L no se expresa de manera constitutiva, como el CD40, si no que su expresión es inducible y transitoria. Se expresa en diferentes tipos celulares como las células epiteliales, las plaquetas, los basófilos, los eosinófilos, y en las células T CD4⁺ activadas, mientras que el receptor CD40 se expresa de sobre otros tipos celulares, como las células B, los macrófagos, las células endoteliales, los fibroblastos (Laman *et al.*, 2017). Cabe mencionar que ambas moléculas se pueden expresar sobre las células dendríticas (Ma &

Clark, 2010). Estas moléculas interactúan formando un complejo CD40-CD40L, que consta de trímeros de CD40L sobre la superficie celular que se unen a su vez a tres moléculas de CD40 (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; Laman *et al.*, 2017).

La interacción CD40-CD40L mejor caracterizada es la que se lleva a cabo entre las células T CD4⁺ activadas y el CD40 sobre la superficie de las células B, lo que culmina en la activación de estas células y conlleva a la diferenciación de la célula B hacia células plasmáticas de vida larga, por ende a la producción de inmunoglobulinas y su respectivo cambio de isotipo, también este complejo es fundamental para la formación de centros germinales en los OLS (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; Laman *et al.*, 2017).

Producción de Anticuerpos

Las Células B

Las células B, o linfocitos B, fueron identificadas en 1965 por Cooper y colaboradores (Wang *et al.*, 2020). Estas células después de la estimulación antigénica tienen la capacidad de diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos y células B de memoria. Estas últimas pueden diferenciarse en células plasmáticas sin pasar por los CG al encontrarse nuevamente con su antígeno. (Hoffman *et al.*, 2016). En el ratón, hay dos tipos de células B caracterizadas por su ontogenia: las células B-1 y las B-2. Las B-1 provienen de progenitores del hígado fetal, mientras que las B-2 provienen de precursores de la médula ósea (LeBien & Tedder, 2008; Hoffman *et al.*, 2016). Las células B-1 se localizan en el ratón adulto, principalmente en la cavidad peritoneal y desde este lugar migran hacia los OLS, con base en la expresión de CD5 estas células se dividen en B-1a (CD5⁺) y B-1b (CD5⁻); hasta el momento, se desconoce si estas dos estirpes celulares son diferentes o simplemente un estadio de activación (Suchanek &

Clatworthy, 2023). Se ha establecido que las células B-1 tienen la capacidad de autorrenovación y reconocen principalmente antígenos TI como el LPS (Baumgarth, 2011; Suchanek & Clatworthy, 2023), también juegan un papel importante en la autoinmunidad (Suchanek & Clatworthy, 2023). En el bazo de los ratones, las células B-1 representan entre el 1 al 2% de la población de células B totales (Baumgarth, 2011). En el ratón las células B-2 se localizan principalmente en los OLS. En el bazo murino se han descrito dos tipos de células B-2, las células B foliculares (convencionales) y las células B de zona marginal (MZ). Las células B de MZ, como su nombre lo indican se localizan en esta zona del bazo y representan del 5 al 20% de la población de células B totales del bazo (Cerutti *et al.*, 2013; Marinkovic & Marinkovic, 2020; Palm & Kleinau, 2021), estas células expresan un BCR polireactivo, una característica distintiva con respecto a las células B-2 y numerosos receptores TLRs, debido a esto responden principalmente a antígenos TI (Figura 2), y responden principalmente contra antígenos de patógenos presentes en la sangre (Zuoli & Richard, 2011; Cerutti *et al.*, 2013; Marinkovic & Marinkovic, 2020; Palm & Kleinau, 2021).

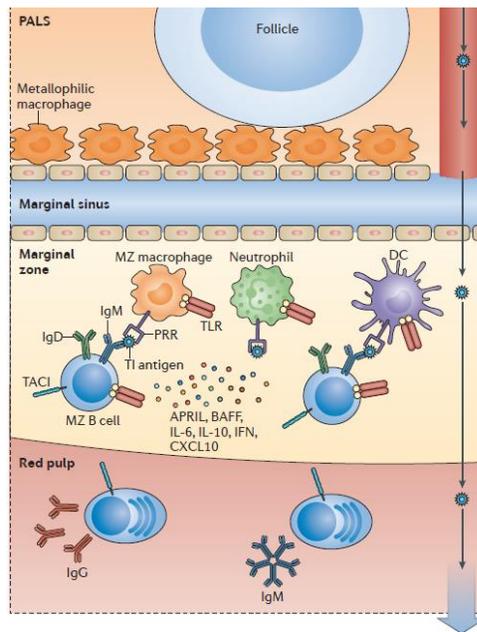


Figura 2. Respuesta TI de las células B de MZ. Tomada de Cerutti *et al.*, 2013)

Las células B-2 convencionales o foliculares se encuentran principalmente en los folículos de los OLS, participan mayormente en reacciones contra antígenos TD, por lo que tras la interacción con la célula T inducen a formación de los CG. Las células B-2, a diferencia de las B de MZ, poseen un BCR monoreactivo y dan origen a anticuerpos con alta especificidad y afinidad por el antígeno. (Palm & Kleinau, 2021; Dirks *et al.*, 2023).

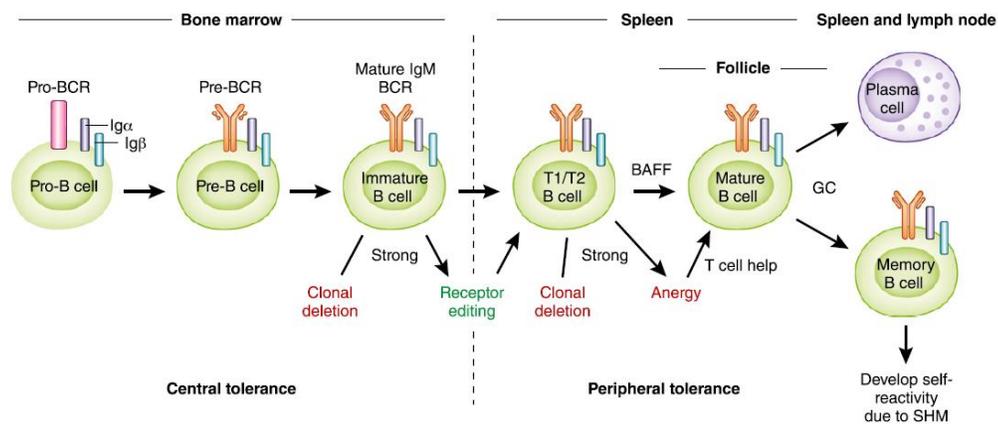


Figura 3. Desarrollo de la célula B. Tomada de Hoffman *et al.*, 2016.

Las células B-2 provienen de la médula ósea, en donde las células B presentan tres estadios pro-B, seguido de pre-B y finalmente de B inmaduras. Cada uno de estos estadios está caracterizado por la expresión de marcadores específicos sobre la membrana y de rearrreglos en los segmentos de las cadenas pesadas y ligeras del BCR (Figura 3). Los rearrreglos de los genes de las cadenas pesadas y ligeras del *bcr* se llevan a cabo por la enzima RAG (“Recombination-activating gene”). Durante el estadio pro-B no se expresa el BCR en la membrana, pero si expresan las proteínas Igα e Igβ (pro-BCR), además los genes de la cadena pesada del BCR sufren un rearrreglo en este estadio. En el estadio de pre-B, la cadena pesada del BCR se ha rearrreglado por lo que se expresa junto con la proteína SCL (“surrogate light chain”) formando un pre-BCR, así mismo se da el rearrreglo de los genes de la cadena ligera. Para el estadio de B inmadura las cadenas ligeras y las pesadas se expresan de manera conjunta formando un BCR maduro. Esta célula B

inmadura, viaja de la médula ósea hacia los OLS donde se encontrará con su antígeno y recibirá las señales adecuadas para diferenciarse en célula plasmática productora de anticuerpos y en una célula B de memoria (LeBien & Tedder, 2008; Kurosaki, 2010; Pieper *et al.*, 2013; Eibel *et al.*, 2014; Hoffman *et al.*, 2016).

Los órganos linfoides secundarios (OLS)

El sistema inmune (SI) provee un ambiente óptimo para la defensa contra patógenos en cualquier parte del cuerpo. Las estructuras donde se organizan las células responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa en el cuerpo son los órganos linfoides primarios y secundarios (Ruddle & Akirav, 2009). Los órganos linfoides primarios son el timo y la médula ósea, son los sitios anatómicos en donde se producen las células T y B, respectivamente (Ohl *et al.*, 2003). Mientras que los OLS son aquellos donde se lleva a cabo la interacción entre los antígenos y las células *naïve* antígeno-específicos para iniciar una respuesta inmune adaptativa (Hofmann *et al.*, 2010), algunos ejemplos son el bazo, los nódulos linfáticos, y las placas de Peyer (PP), por mencionar algunos.

Todos los OLS están compuestos principalmente por células T, B, células presentadoras de antígeno, células estromales y de soporte vascular, aunque existen marcadas diferencias como la vascularización, el modo de entrada del antígeno, el ambiente local y los estímulos a los que están sujetos (Ruddle & Akirav, 2009). Los OLS en general están irrigados por vasos linfoides aferentes y eferentes, es por los vasos aferentes que llegan los antígenos a estos órganos, mientras que los eferentes permiten la salida de células efectoras (Arasa *et al.*, 2021).

Bazo

El bazo es el OLS mejor caracterizado y es el único OLS que se ha identificado desde los peces mandibulares, los anfibios, los reptiles, las aves y los mamíferos (Neely & Flajnik, 2016). El bazo, anatómica y funcionalmente está dividido en dos regiones: la pulpa roja y la pulpa blanca (Lewis *et al.*, 2019; Neely & Flajnik, 2016; Ruddle & Akirav, 2009; Mebius & Kraal, 2005). En el bazo de los ratones, entre la pulpa roja y la pulpa blanca, se encuentra la zona marginal a la cual se le denomina zona perifolicular en el bazo de los humanos (Lewis *et al.*, 2019). La función de la pulpa roja es filtrar la sangre removiendo a los eritrocitos dañados o senescentes del organismo, por lo que actúa como un sitio de almacenaje y reciclaje del hierro. Mientras que la pulpa blanca es el componente linfoide del bazo, en donde las células T, B y las células presentadoras de antígeno residen (Lewis *et al.*, 2019; Neely & Flajnik, 2016; Ruddle & Akirav, 2009; Mebius & Kraal, 2005) (Figura 4).

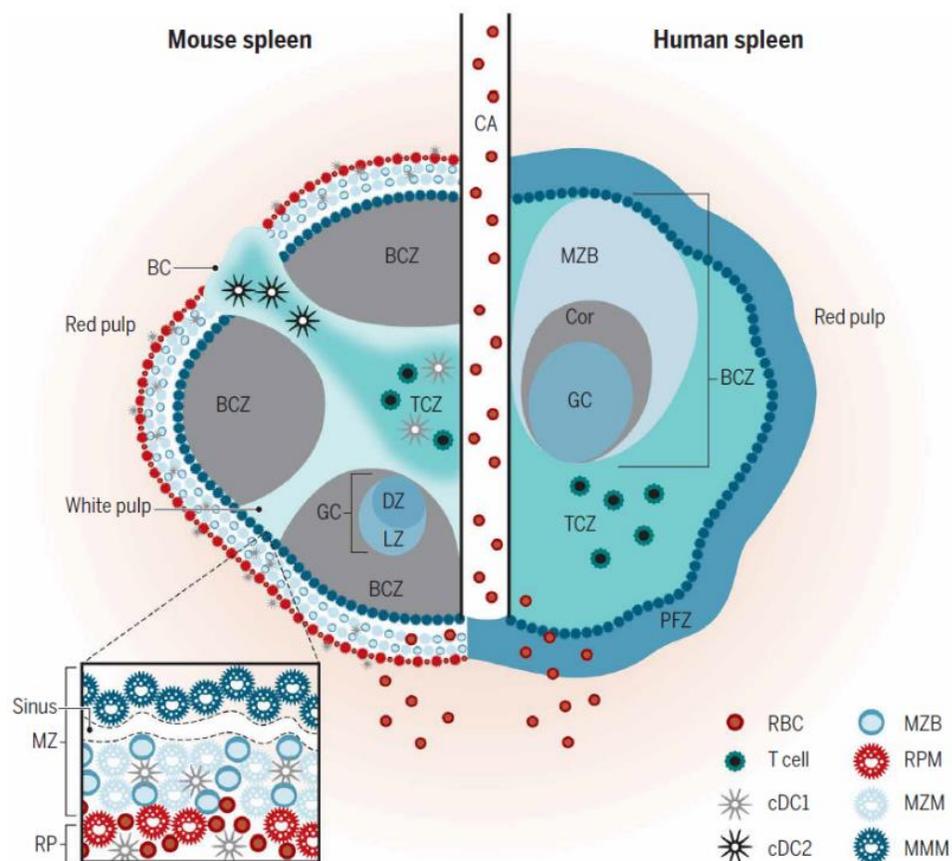


Figura 4. Estructura general del bazo en ratón y humano. Tomado de Lewis *et al.*, 2019

Las placas de Peyer

Las placas de Peyer fueron descritas por primera vez en el año 1677 por el fisiólogo y anatomista Joseph Hans Conrad Peyer, junto con el ganglio mesentérico son los principales OLS del intestino (Newberry & Lorenz, 2005; Makala *et al.*, 2002). Las PP contienen nichos microanatómicos especializados para la eficiente iniciación y propagación de la respuesta inmune adaptativa (Mörbe *et al.*, 2021). En el ratón se encuentran a lo largo del intestino delgado, y en humanos se localizan preferentemente en el *ileum* (Newberry & Lorenz, 2005; Makala *et al.*, 2002). La cantidad de PP sobre el intestino puede variar entre las especies, por ejemplo, en el ratón se han descrito entre 5 a 14, mientras que en el humano pueden existir más de 300 (Makala *et al.*, 2002). En comparación con cualquier otro OLS las PP no son irrigadas por vasos linfáticos aferentes, debido a que en la parte luminal cuentan con una capa de células epiteliales especializadas conocida como FAE (“follicle-associated epithelium”). En el FAE se encuentran las células M, las cuales tienen micropliegues especializados que cuentan con moléculas de adhesión únicas (Sauls & Taylor, 2021) y son las encargadas del transporte de antígenos luminales hacia el domo subepitelial (SED, subepithelial dome) (Mörbe *et al.*, 2021; Newberry & Lorenz, 2005; Makala *et al.*, 2002). El SED del ratón está constituido principalmente por células dendríticas presentadoras de antígeno y de otras células mieloides, además el SED de los humanos también contiene células T y B (Barone *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2020; Mörbe *et al.*, 2021). Cercano al SED se encuentra el folículo o zona de células B, dentro del cual pueden formarse los CG los centros germinales, así como zonas de células T interfoliculares (Mörbe *et al.*, 2021) (Figura 5).

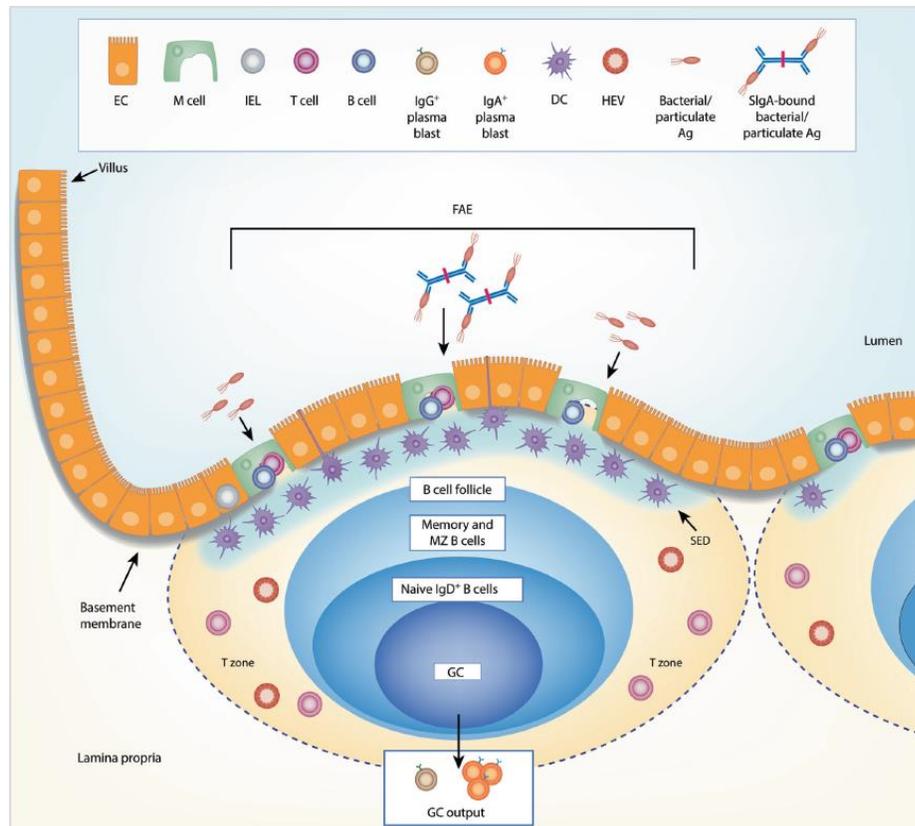


Figura 5. Estructura general de una PP en humano. Tomada de Mörbe *et al.*, 2021.

El Centro Germinal

Los centros germinales (CG) son estructuras secundarias especializadas que se forman dentro de los folículos de los OLS durante la respuesta inmune adaptativa, los cuales contienen grandes agregados de células B proliferantes (Hauser *et al.*, 2010; Huang, 2020; Gars *et al.*, 2020). En los CG se seleccionan las células B que se diferenciarán a células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad (Young & Brink, 2021).

En los primeros días después de una inmunización o infección, las células B que han sido activadas por la interacción del antígeno con su BCR, migran hacia el borde T-B en búsqueda de células T CD4⁺, quienes proveen las señales para su proliferación, formando un pre-CG (Young & Brink, 2021). A

los 5-10 días post-infección o inmunización se forman los CG maduros dentro de los cuales se pueden distinguir dos zonas funcionalmente distintas, la zona oscura (ZO) y la zona clara (ZC) (Young & Brink, 2021) (Figura 6).

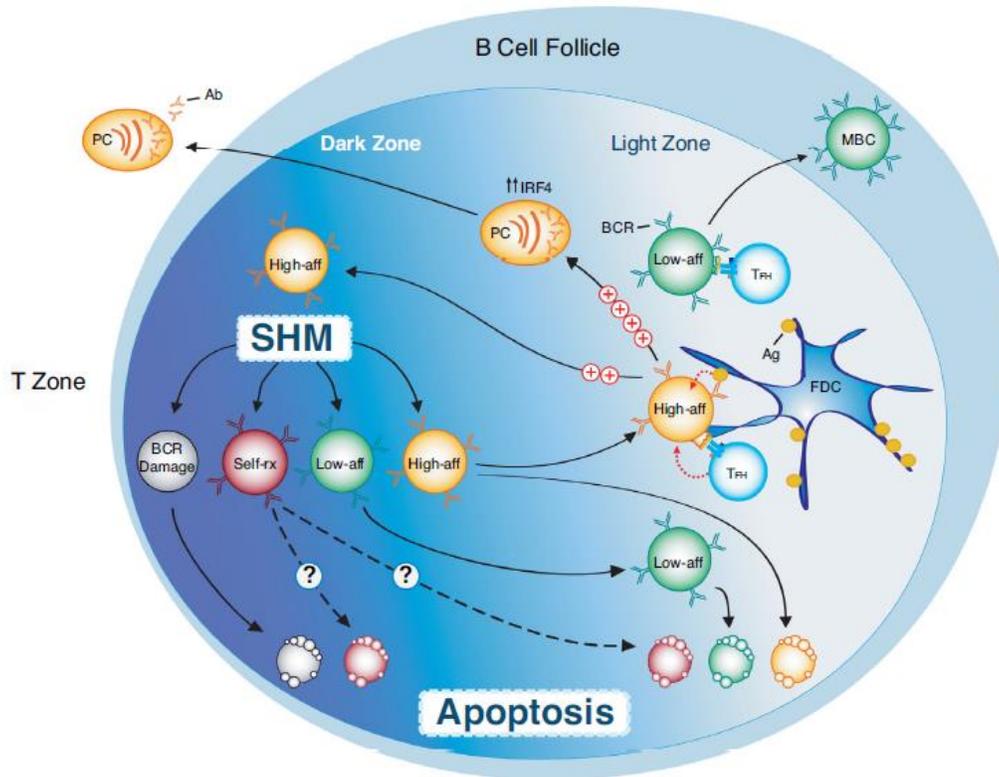


Figura 6. Estructura y función de un Centro Germinal. Tomada de Lau & Brink, 2020.

La ZO es un sitio con una alta tasa de proliferación de células B y es aquí donde sucede la hipermutación somática (HMS), el proceso por el cual las regiones variables de los genes de las cadenas pesadas y ligeras del BCR sufren mutaciones puntuales acumuladas que incrementan la afinidad por el antígeno, este proceso es dependiente de la actividad de la enzima AID ("Activation-induced cytidine deaminase) (Young & Brink, 2021). La ZC es el sitio donde se lleva a cabo la selección positiva de las clonas de células B que adquirieron una mayor afinidad por el antígeno como resultado de la HMS. Las células que sufren algún daño en su BCR, que son auto-reactivas o que poseen una baja o muy alta afinidad mueren por apoptosis. Entre la ZC y la

ZO se puede dar una migración bidireccional con rondas sucesivas de HMS y selección positiva (Huang 2020; Lau & Brink, 2020; Young & Brink, 2021).

El cambio de Isotipo

El cambio de isotipo (CI) es un evento intracromosomal de recombinación-delección que culmina con el remplazo del exón $C\mu$ de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig) por la región $C\gamma$, $C\epsilon$, o $C\alpha$, dependiendo de que inmunoglobulina se vaya a producir, IgG, IgE o IgA, respectivamente (Xu *et al.*, 2012; Yu & Lieber, 2019; Fleming *et al.*, 2022).

La estructura del loci de la Ig contiene regiones constantes (C) en tándem (en el ratón μ , δ , $\gamma3$, $\gamma1$, $\gamma2b$, $\gamma2a$, ϵ , α ; y en los humanos μ , δ , $\gamma3$, $\gamma1$, $\gamma2$, $\gamma4$, ϵ , $\alpha1$, $\alpha2$) localizados río abajo de la región variable. Cada región C esta precedida por regiones largas repetidas (2-10 kb) conocidas como regiones S (“switch regions”) que sirven como blanco de la recombinación. Durante el CI en las regiones S se generan y unen rupturas de doble cadena en el donador (μ) y en el aceptor (γ , ϵ , α) para generar un nuevo rearrreglo. El CI es un mecanismo molecular, el cual se inicia cuando en los promotores intrónicos río arriba de la región S inician la transcripción de los transcritos de línea germinal (TLG). La secuencia única de nucleótidos repetidos en la región S permite la formación de estructuras tipo burbuja denominadas horquillas R (“R loops”) en el DNA a medida que avanza la transcripción, por lo que la hebra del DNA complementaria a la cadena que se está transcribiendo se desplaza, formando un DNA monocatenario, que es el sustrato de la enzima AID. Posteriormente, se da la formación de rupturas de doble cadena y es a través del sistema de reparación por escisión de bases que se repara el daño. La región donante, que siempre es la región $S\mu$, se une a la región S receptora de la región constante que se está sustituyendo y las secuencias del DNA intermedias de otras regiones constantes se eliminan (Figura 7) (Cerutti, 2008; Xu *et al.*, 2012; Fleming *et al.*, 2022).

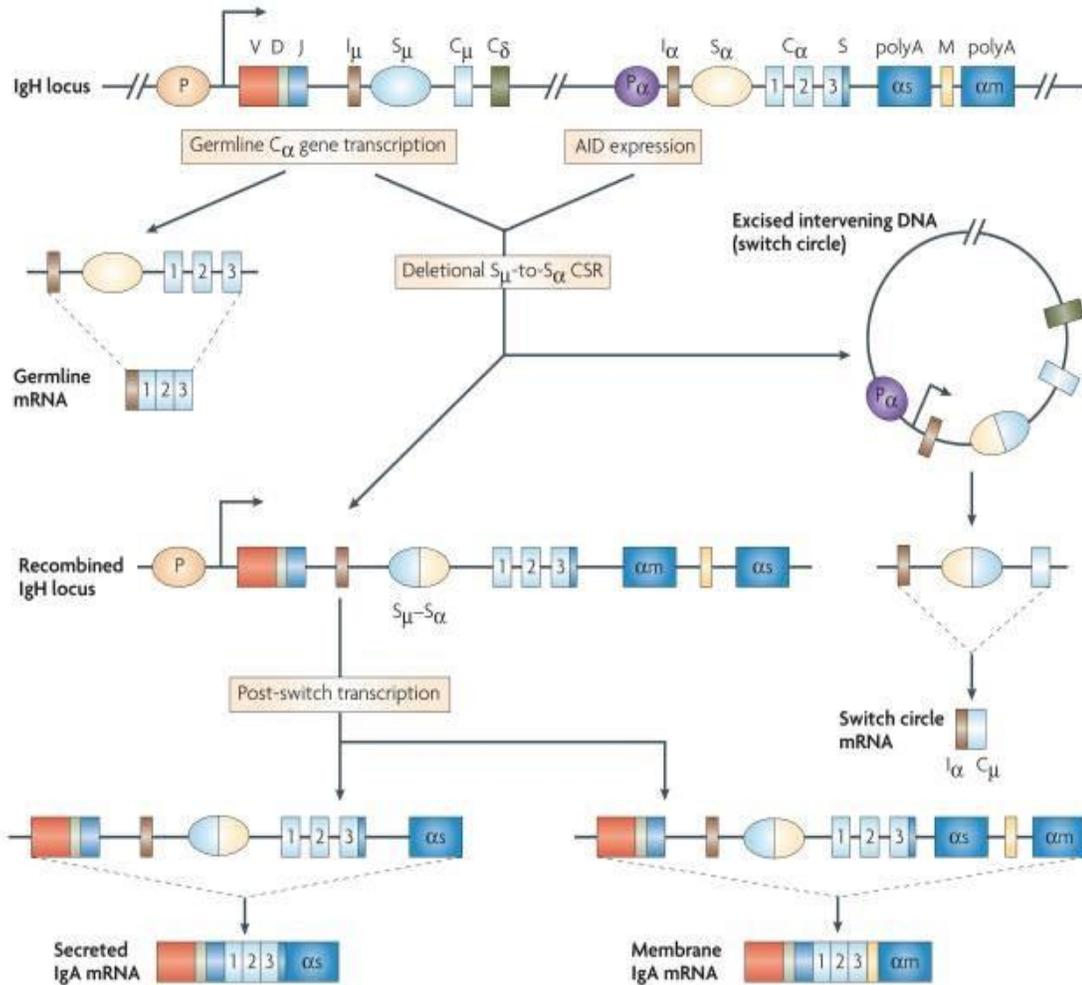


Figura 7. Mecanismo del CI. Tomada de Cerutti, 2008.

Existe una amplia evidencia de que el CI se lleva a cabo antes de la formación del CG y de manera poco frecuente en el CG (Pape *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016; Roco *et al.*, 2019).

El mecanismo molecular del CI está determinado por distintas señales, clasificadas en primarias y secundarias. Las señales primarias más conocidas son los receptores tipo Toll (TLR) y la interacción CD40L-CD40 (Fleming *et al.*, 2022).

Por otra parte, las señales secundarias son debidas a citocinas que en presencia o ausencia de las señales primarias pueden dirigir el CI, algunas de éstas son: BAFF (“B cell activating factor”), APRIL (“a proliferation-inducing

ligand”), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), interleucina (IL) 10, IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-17A, e IL-21 (Fleming *et al.*, 2022).

La inmunoglobulina A (IgA)

La IgA es una de las tres inmunoglobulinas producidas como resultado del CI, esta Ig es la más abundantemente en las mucosas de los ratones y de los humanos (Cerutti, 2008; Reboldi *et al.*, 2016; Bunker & Bendelac, 2018; Pabst & Slack, 2020). La IgA está constituida por 2 cadenas pesadas unidas covalentemente a dos cadenas ligeras, el fragmento Fab, el cual se une al antígeno, está constituido por una cadena ligera y una pesada. La región debajo de la región bisagra se conoce como fragmento Fc (Figura 6) (Seikrit & Pabst, 2021). En los ratones solo se ha descrito un isotipo de IgA, mientras que en humanos existen 2 isotipos, la IgA1 y la IgA2. La diferencia estructural más notable entre los isotipos IgA de humanos radica en su región bisagra (Figura 6). La región de la bisagra de la IgA1 está constituida por 22 aminoácidos (aa), además contiene O-glicanos. Mientras que la IgA2 tiene 16 aa menos en esta región y no contiene O-glicanos (Figura 8). Esta reducción en el número de aa de la IgA2 disminuye la posibilidad al corte proteolítico, lo que incrementa su estabilidad en un ambiente como el del colon en comparación con la IgA1 (Cerutti, 2008; Macpherson *et al.*, 2008; Pabst, 2012; Pabst & Slack, 2020).

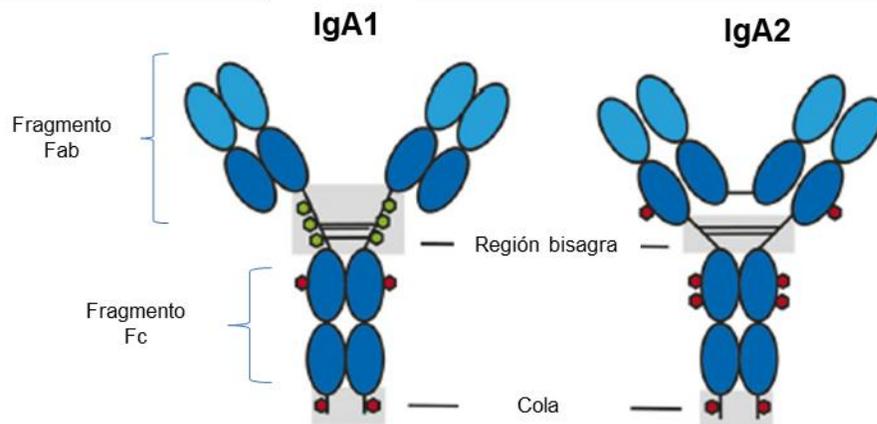


Figura 8. Estructura de las IgA's humanas. Tomada de Seikrit & Pabst, 2021. Círculos rojos: N-glicanos, círculos verdes: O-glicanos.

Una característica de la IgA de mucosas es que se secreta de manera dimérica, mientras que la sérica se secreta de manera monomérica. La IgA dimérica está constituida por dos monómeros unidos covalentemente por su región Fc o región constante a través de la cadena J. La cadena J es una proteína que puede ser reconocida por el receptor de la inmunoglobulina polimérica (pIgR) que se encuentra en la cara baso lateral de las células epiteliales y es quien se encarga de transportar a la IgA a través de la célula epitelial hacia la parte apical y poder ser secretada hacia el lumen, lo cual se lleva a cabo por el corte del pIgR liberando el componente secretor (Suzuki *et al.*, 2007; Strugnell & Wijburg, 2010; Seikrit & Pabst, 2021; Huus *et al.*, 2021).

Se han descrito 2 mecanismos para la producción de la IgA en las mucosas (Figura 9). La IgA que se produce en respuesta a antígenos TD y a antígenos TI. La respuesta ante antígenos TD requieren de la formación de un CG, de la proliferación de las células B y de la HMS, este proceso se estima que se lleva a cabo por más de 7 días (Young & Brink, 2021). Durante la formación y la reacción del CG, las interacciones de las células B con las células T CD4⁺ son primordiales, particularmente la interacción entre el CD40, presente en las células B y CD40L, presente en las células T CD4⁺ activadas, esta interacción promueve en las células B el incremento en la secreción de citocinas y la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión (Chatzigeorgiou *et al.*,

2009). Una de las citocinas que se induce por esta interacción es TGF β la cual tiene un papel importante en la polarización de las respuestas inmunes hacia la producción de anticuerpos de clase IgA. En cambio, para las respuestas contra antígenos TI, las células B no requieren de la interacción con las células T, por lo tanto, tampoco de la interacción entre CD40 y CD40L, por ello, las respuestas TI son más rápidas que las respuestas TD, de 3 a 5 días (MacLennan *et al.*, 2006; Elsner & Shlomchik, 2020).

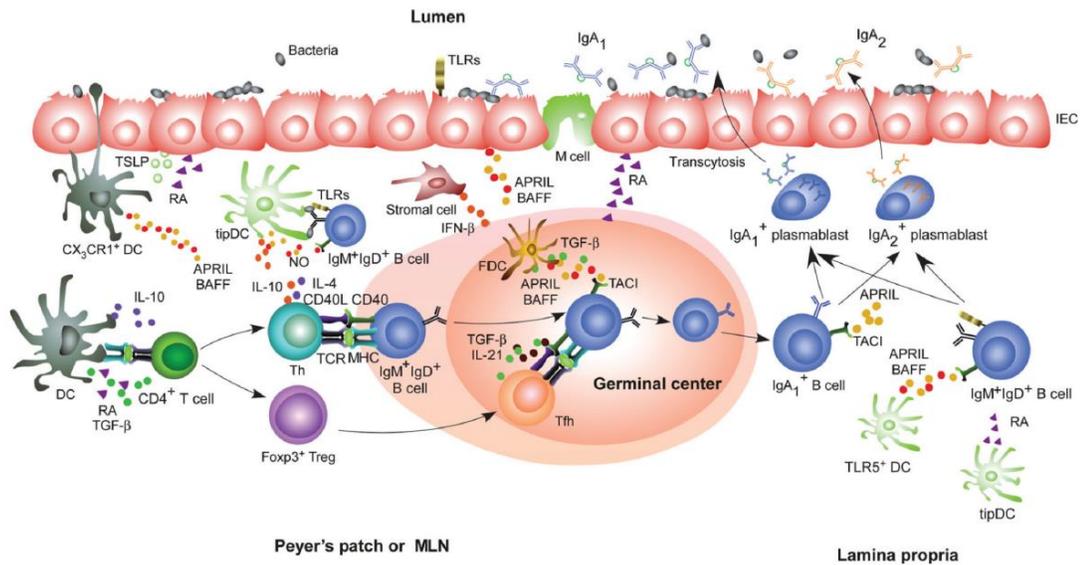


Figura 9. Diagrama general del mecanismo TD y TI. Tomada de Cerutti *et al.*, 2011.

En las células B el microambiente de citocinas que favorece el CI contra antígenos TI provienen de las células dendríticas quienes a través de sus TLRs interaccionan con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en el microambiente intestinal, como el LPS de las bacterias Gram negativas, estimulando que estas células dendríticas produzcan moléculas como TGF β , BAFF y APRIL. Estas citocinas en su conjunto favorecen la expresión del TLG de la región constante α y de AID al interactuar con sus receptores TGF β -R, BAFF-R, BCMA (“B-Cell Maturation Antigen”) y TACI (“transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand

interactor”) (Figura 9) (Cerutti, 2008; Strugnell & Wijburg, 2010; Fagarasan *et al.*, 2010; Cerutti *et al.*, 2011; Bunker & Bendelac, 2018; Seikrit & Pabst, 2021).

Citocinas y receptores implicados en la producción de IgA T independiente

Para que se lleve a cabo el CI los factores más importantes son el microambiente, que es el resultado del tipo de células que estén presentes y de las citocinas que estas células producen, así como de la región anatómica. En el intestino, generalmente la producción de anticuerpos IgA TI se lleva a cabo en la lámina propia, aunque también puede realizarse dentro de las PP (Cerutti *et al.*, 2011; Hand & Reboldi, 2021). Las células T tienen un papel fundamental en la inducción de las células plasmáticas productoras de anticuerpos IgA contra antígenos TD, mientras que las células dendríticas (CD) son las necesarias para la inducción de células plasmáticas productoras de IgA contra antígenos TI (Ueda *et al.*, 2007; Cerutti, 2008; Tezuka & Ohteki, 2019).

Por otro lado, el microambiente favorable para la polarización hacia la producción de IgA requiere de la participación de las citocinas BAFF, APRIL y TGF β , donde BAFF y APRIL son miembros de la familia TNF. BAFF (también conocida como TNFSF13B y BLYS) puede unirse a tres receptores diferentes: BAFF-R (donde BAFF es su único ligando), TACI y a BCMA, a estos últimos también se les puede unir APRIL. (Schweighoffer & Tybulewicz, 2021; McAllister & Jellusova, 2021; Eslami & Schneider, 2021). La unión entre BAFF y el BAFF-R sobre la célula B induce la supervivencia de las células B maduras naïve (Smulski & Eibel, 2018; Schweighoffer & Tybulewicz, 2021). APRIL o TNFSF13, participa en la inducción del CI a través de su unión al receptor TACI, así como en la supervivencia de los plasmocitos a través de su unión al receptor BCMA (Vincent *et al.*, 2014; Baert *et al.*, 2021). TACI, que se encuentra sobre la superficie de la célula B y otras células inmunes, regula la

homeostasis, la diferenciación y la función de las células B. Se han descrito 2 variantes de TACI derivadas del *splicing* alternativo, la isoforma corta (TACI-S) y la isoforma larga (TACI-L), TACI-S une con mayor afinidad a las citocinas BAFF y APRIL que la TACI-L (Zhang *et al.*, 2015; Xu & Lam, 2020; Salzer & Grimbacher, 2021). Utilizando animales deficientes de TACI se demostró que este receptor juega un papel fundamental en la producción de IgA intestinal contra antígenos TI (Grasset *et al.*, 2020).

La citocina TGF β es producida por todas las células del SI y por otras células, como las células epiteliales. (Godlewski *et al.*, 2007). En los linfocitos, TGF β participa en la regulación de la proliferación, en su diferenciación y en su supervivencia. En el intestino esta citocina es un elemento importante para mantener un estado de tolerancia (Godlewski *et al.*, 2007) y favorecer el CI hacia IgA (Cerutti *et al.*, 2011).

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, que es parte de la microbiota intestinal. *E. coli* coloniza el tracto intestinal de los mamíferos dentro de las primeras dos semanas de vida (Gilliland *et al.*, 2012). El nicho de *E. coli* comensal es la capa mucosa del colon, donde evita el establecimiento de los patógenos, provee al hospedero de las vitaminas que este no sintetiza como B12 y K y también participa en la maduración y la activación del SI (Blount, 2015).

Sin embargo, existen cepas de *E. coli* que han adquirido factores de patogenicidad a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes, los cuales le han conferido la capacidad para adaptarse a nuevos nichos y causar enfermedad en humanos. Con base en su patogenicidad y el lugar de infección, las *E. coli* patógenas se han clasificado en grupos, tal es el caso de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos (PEDs) (Kaper *et al.*, 2004). Hasta el momento, con base en la presencia de factores de patogenicidad se han

caracterizado seis PEDs (Tabla 1): *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) y *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC), en este último grupo están incluidas la *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (Gomes *et al.*, 2016).

Patotipo de <i>E. coli</i>	Características	Genes asociados
EPEC	Presencia de intimina (como marcador de la isla de patogenicidad LEE) y BFP (<i>Bundle-forming pilus</i>) contenidas en el plásmido EAF	<i>eaeA</i> , <i>bfpA</i>
ETEC	Presencia de las toxinas termo lábil (LT) y termo estable (ST)	<i>lt</i> , <i>st</i>
EIEC	Presencia del locus asociado a invasión (IAL)	<i>ial</i>
STEC	Presencia de la toxina Shiga 1 (STX1) y 2 (STX2), además, algunas cepas también tienen intimina	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eaeA</i>
EAEC	Presencia de regulón maestro AggR con los genes asociados a la adherencia agregativa (AA) y la virulencia controlados por este regulón	<i>aggR</i>
DAEC	Presencia de adhesinas afimbriales en la superficie como AfaE-I y AfaEI-I, que se codifican en el operón Afa/dr/daa	<i>afaC</i>

Tabla 1. Características de los patotipos de *E. coli*. Tomada y modificada de Patzi-Vargas *et al.*, 2015.

EAEC, está asociada a diarrea aguda y persistente en niños de regiones poco desarrolladas y es la segunda causa de diarrea del viajero (Adachi *et al.*, 2001; Estrada-García y Navarro-García, 2012). En México, Estrada-García *et al.* (2005) describió que EAEC es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea aguda en niños que requirieron hospitalización. En regiones menos desarrolladas del mundo, la diarrea causada por EAEC y su infección se han asociado con déficit de crecimiento y función cognitiva en niños desnutridos (Guerrant *et al.*, 2008).

Las cepas de EAEC se caracterizan por el patrón de adherencia-agregativa (AA) (que asemeja a ladrillos apilados) cuando se incuban con células HEp2 (cultivo celular derivado de un carcinoma epidermoide humano) (Nataro *et al.*, 1987). La capacidad de AA de las cepas de EAEC se debe a la presencia de las fimbrias de adherencia agregativa (AAF por sus siglas en inglés) codificadas en el plásmido de adherencia agregativa (pAA), este plásmido también alberga genes que codifican para otros factores de virulencia. El regulador transcripcional maestro denominado AggR, que pertenece a la familia de los activadores transcripcionales AraC/XylS, regula a los factores de patogenicidad del plásmido pAA, así como los presentes en el cromosoma de las EAEC, por lo que se denominan EAEC típicas (tEAEC) a las cepas que contienen al regulón maestro AggR (Kaper *et al.*, 2004).

EAEC se establece sobre la capa del moco intestinal e induce la formación de dispersina (codificada por *aap*), proteína que recubre la superficie de la bacteria, la cual le permite moverse a través del moco, llegar a la superficie del enterocito y unirse mediante las fimbrias a este. Una vez adherida EAEC estimula la producción de moco y la formación de una biopelícula (Kaper *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2009; Sheikh *et al.*, 2002). Recientemente se desarrolló un modelo murino en ratones C57BL/6 silvestres para el estudio de los mecanismos de patogenicidad de este patotipo (Moran-García *et al.*, 2022).

Planteamiento del Problema y Justificación

La interacción del ligando de CD40 (CD40L), expresado transitoriamente en la superficie de las células T CD4⁺ activadas, con su receptor CD40, expresado constitutivamente sobre las células B, es fundamental en la inducción y en el control de la inmunidad humoral T dependiente (TD) y en las respuestas inmunes mediadas por células. Mutaciones en el gen que codifica para CD40L son responsables del 65-70% de los casos del síndrome de hiper IgM (HIGM). Las personas con HIGM tienen una predisposición a infecciones recurrentes y prolongadas de patógenos comunes u oportunistas, tanto en el tracto respiratorio como en el tracto digestivo. En 1994, se desarrolló un ratón C57BL/6 deficiente del ligando de CD40 (*cd40l^{-/-}*), el cual se ha propuesto como modelo subrogado del HIGM, ya que presenta un perfil de inmunoglobulinas séricas basales muy similar al que presentan los pacientes con HIGM. Además, al igual que estos sujetos se ha demostrado que estos animales son más susceptibles a infecciones por patógenos intestinales, incluyendo a patógenos que solo infectan a humanos. La respuesta humoral sérica de los ratones *cd40l^{-/-}*, también se ha evaluado tanto ante antígenos TD y TI, como ante un patógeno murino bacteriano (*Citrobacter rodentium*). En estos ratones deficientes, varios estudios han mostrado que hay una respuesta de tipo TI, que en el suero producen cantidades similares al silvestre de IgG3, pero que a pesar de que los niveles de IgG2b son significativamente menores que en el ratón silvestre, éstos tienen un efecto bactericida mediado por complemento. También se han evaluado en las heces de los ratones *cd40l^{-/-}* las inmunoglobulinas IgG y la IgA, mostrando que la IgG está disminuida con respecto al ratón silvestre como la IgG sérica, mientras que las concentraciones de la IgA intestinal están significativamente incrementadas. Esta cepa de ratón carece de CG en los OLS como el bazo, el ganglio inguinal y las PP. Además, se han caracterizado diferentes poblaciones de células B y células plasmáticas en condiciones basales. Dada la importancia de la respuesta humoral para la eliminación de patógenos, es importante

caracterizar las poblaciones de las células B y las células plasmáticas tanto en condiciones basales como ante un patógeno. En los ratones silvestre C57BL/6 se ha desarrollado un modelo murino de infección contra la bacteria EAEC, que es la segunda causa de diarrea infantil en niños menores de 5 años en México y de la diarrea del viajero en adultos. Este modelo murino permitirá evaluar las poblaciones de células B y de las células plasmáticas ante un patógeno de humanos, con el fin de dilucidar los mecanismos que se inducen en los ratones deficientes ante una bacteria patógena y establecer terapias para el tratamiento de estas enfermedades en pacientes con HIGM.

Hipótesis

- Los ratones *cd40^{f/-}* inoculados oralmente con *E. coli* enteroagregativa (EAEC) tienen una respuesta inmune polarizada hacia reacciones TI en las placas de Peyer y en el bazo, con respecto a los ratones silvestres.

Objetivos

General

Caracterizar y comparar las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo y en las placas de Peyer de ratones C57BL/6 silvestres y *cd40^{f/-}* antes y después de la inoculación oral con EAEC.

Particulares

- Evaluar el efecto de la dosis de infectiva de 5×10^9 UFC de EAEC sobre el peso relativo y la colonización de los ratones silvestres y *cd40^{f/-}*.
- Determinar las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo de ratones C57BL/6 silvestres y *cd40^{f/-}* en estado basal y a los 8 días post inoculación con EAEC.
- Determinar las poblaciones de células B y células plasmáticas en las placas de Peyer de ratones C57BL/6 silvestres y *cd40^{f/-}* en estado basal y a los 8 días post inoculación con EAEC.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones con fondo genético C57BL/6 de 8-12 semanas machos y hembras silvestres y *cd40^{fl}*. Todos los animales se resguardaron en cajas con filtros microaisladores esterilizados, con acceso *ad libitum* a agua y comida esterilizadas. Previo a la inoculación con EAEC se verificó que los ratones estuviesen libres de *E. coli*, sembrando las heces en agar MacConkey, las cajas se incubaron a 37°C por 24 h.

Infección con EAEC 042

Tres días antes de la inoculación de los ratones la cepa de EAEC 042 (la cepa prototipo de EAEC típica) se sembró por estría cruzada sobre agar MacConkey. Al día siguiente, se seleccionó una colonia aislada, la mitad de la colonia se utilizó para realizar una PCR punto final y que identifica la presencia de los genes *AggR*, *aata* y *aap*, característicos de esta cepa (Patzí-Vargas *et al.*, 2013). Una vez verificado que la colonia tuviera los genes, el resto de la colonia se sembró por estría cruzada en otra placa de agar MacConkey y se incubó como ya se mencionó anteriormente. Al día siguiente se seleccionó una colonia aislada, se sembró en 5 mL de caldo LB estéril y se incubó toda la noche a 37°C sin agitación. El día de la inoculación se tomó 1 mL del caldo de LB con el cultivo y se colocó en 24 mL de caldo LB estéril y se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) por 4 h. Se determinó por espectrofotometría a 600 nm (Espectrofotómetro SmartSpec© 300, Bio-Rad, EUA) que el cultivo tuviera aproximadamente una concentración de 1×10^9 UFC (unidades formadoras de colonias). A partir de este cultivo se prepararon las dosis para inocular a los ratones en 100 μ L de solución salina (SS) con una concentración de 5×10^9 UFC establecida previamente (Morán-García *et al.*, 2022).

Utilizando una sonda gástrica 5 min antes de la inoculación a cada ratón se le administró 50 μL de bicarbonato de sodio 3.5 M (NaHCO_3) con el fin de neutralizar el pH gástrico, pasado este tiempo los ratones silvestres y *cd40l^{-/-}* fueron inoculados vía sonda orogástrica con 5×10^9 UFC/100 μL y el grupo control, al cual también se le neutralizo el pH estomacal, se les administro por la misma vía SS (Figura 10).

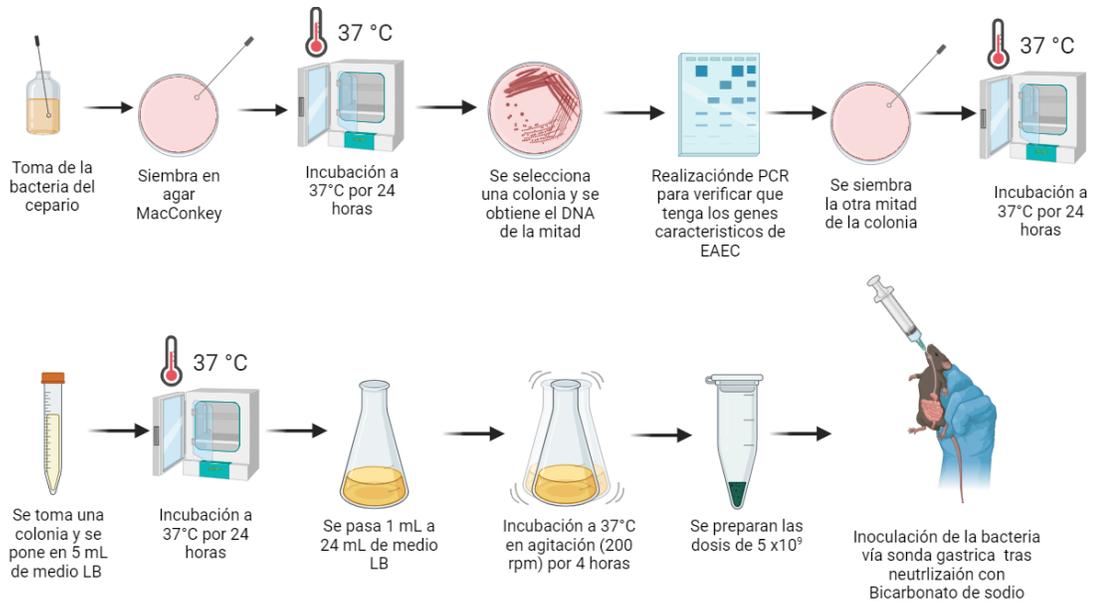


Figura 10. Metodología para la infección con EAEC. Realizada en Bio-Render. No. de licencia CY25ZIKYHC

Mantenimiento y muestreo de los ratones post-infección

Los ratones se mantuvieron en el bioterio del CINVESTAV, hasta el día de la inoculación. El día de la inoculación se trasladaron al laboratorio en donde fueron inoculados en la campana de flujo laminar, para su supervisión se mantuvieron en el laboratorio durante todo el experimento. Diariamente se registró el peso del animal y se recolectaron las heces, las cuales se pesaron y se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 mL de SS estéril y se pesaron nuevamente. Los tubos con heces se agitaron utilizando un vortex hasta su

homogenización, se realizaron diluciones de las muestras, las cuáles se sembraron en placas de agar MacConkey se incubaron a 37°C por 24 h.

Evaluación de la colonización

La colonización de EAEC 042 en los ratones silvestres y de los *cd40l*^{-/-} se evaluó en las heces de los ratones desde el primer día post-inoculación (PI) hasta el día de su sacrificio, mediante la determinación de las UFC por gramo de heces (UFC/g heces) de EAEC, como ya se describió previamente. La presencia de los genes característicos de EAEC 042 se evaluó colectando una colonia por PCR de punto final.

Obtención y procesamiento de órganos de los ratones

A los ratones silvestres y *cd40l*^{-/-} se les aplicó la eutanasia vía dislocación cervical. Se obtuvieron los órganos de interés: el bazo y las PP. Los órganos fueron macerados en PBS 1X (pH 7.2) con ayuda de dos portaobjetos con borde esmerilado para obtener las suspensiones celulares, estas suspensiones se filtraron utilizando filtros celulares de 40 µm (S/M, EUA) en tubos Falcon de 15 mL, y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó el sobrenadante de los tubos, el botón se resuspendió en 1 mL de PBS 1X y se contaron las células en una cámara de Neubauer (Optik Labor, Alemania).

Citometría de flujo

Las suspensiones celulares del bazo y las PP de los ratones silvestres y *cd40l*^{-/-} se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Para las tinciones celulares se

debe de contar con al menos 2×10^6 células del bazo y 5×10^5 células de las PP. Para identificar a las células B IgA positivas-células plasmáticas, el botón celular se resuspendió suavemente en 50 μ L de la mezcla 1 (ver detalles abajo). Para identificar a las células B naïve-B dobles negativas para IgD e IgM-B IgM positivas, el botón celular se resuspendió en 50 μ L de la mezcla 2 (ver detalles abajo). Las suspensiones celulares se incubaron por 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con 500 μ L de PBS 1X, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. A la suspensión de células con la mezcla 1 se le añadieron 50 μ L de estreptavidina acoplada a Alexa Fluor 488 (1: 2000) (Invitrogen, Cat. S11223), se incubó por 20 min a temperatura ambiente, se lavaron las células con 500 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. Tanto las suspensiones de la mezcla 1 como de la mezcla 2 se fijaron con 200 μ L de formaldehído al 1% durante 10 min, se lavaron con 500 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. Los botones celulares se resuspendieron en 500 μ L de PBS 1X y se pasaron a tubos FACS (Beackman Coulter, EUA). Los tubos se leyeron en el citómetro de flujo CytoFlex (Beackman Coulter, EUA) y para analizar los resultados se utilizó el software FlowJo versión 10 (EUA).

Mezcla 1

Para la Mezcla 1 se utilizaron los anticuerpos: anti-mouse-CD19-BV605 (1: 200) (Becton Dickinson Horizon, Cat. 563148), el marcador de viabilidad Fixable Viability Dye eFluor (1: 2000) (eBioscience, Cat. 65-0863-14), anti-mouse-IgA biotinado (1: 200) (eBioscience, cat. 13-5994-82) y anti-mouse C138-PE (1:500) (Becton Dickinson Pharmigen Cat. 553714).

Mezcla 2

Para la Mezcla 2 se utilizaron los anticuerpos: anti-mouse-CD19-BV605 (1: 200) (Becton Dickinson Horizon, Cat. 563148), el marcador de viabilidad Fixable Viability Dye eFluor (1: 2000) (eBioscience, Cat. 65-0863-14), anti-mouse IgD-PE (1: 800) (eBioscience Cat. 12-5993-83) y anti-mouse IgM-FITC (1: 500) (Southern Biotech Cat.10-20-08).

Análisis estadístico

Los resultados de citometría de flujo se procesaron con el software Prism (Graph-Pad versión 8.3.0). Se utilizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias entre los grupos de ratones silvestres y *cd40l^{-/-}* y entre el estado basal y los 8 días PI.

Resultados

Peso relativo y colonización de los ratones C57BL/6 y *cd40l*^{-/-} con la dosis infectiva de 5x10⁹ UFC de EAEC

Con el fin de determinar si los ratones deficientes se colonizaban con EAEC se empezó evaluando ratones de 8-12 semanas. Ningún ratón de las dos cepas falleció al ser inoculado con la dosis 5x10⁹ UFC/100 µL, estandarizada para ratones silvestres de 6 semanas (Moran-García *et al.*, 2022). En la figura 11 A y B, se ilustra la comparación entre el comportamiento del peso de los ratones PI y con SS de ambas cepas de ratones. En la comparación entre los ratones silvestres (8 a 12 semanas de edad) solo los ratones inoculados mostraron una pérdida significativa de peso a los días 1 y 2, con respecto a los controles no inoculados (Figura 11A). Los ratones *cd40l*^{-/-} (8 a 12 semanas de edad) no mostraron pérdida de peso en comparación con los ratones no inoculados (Figura 11B).

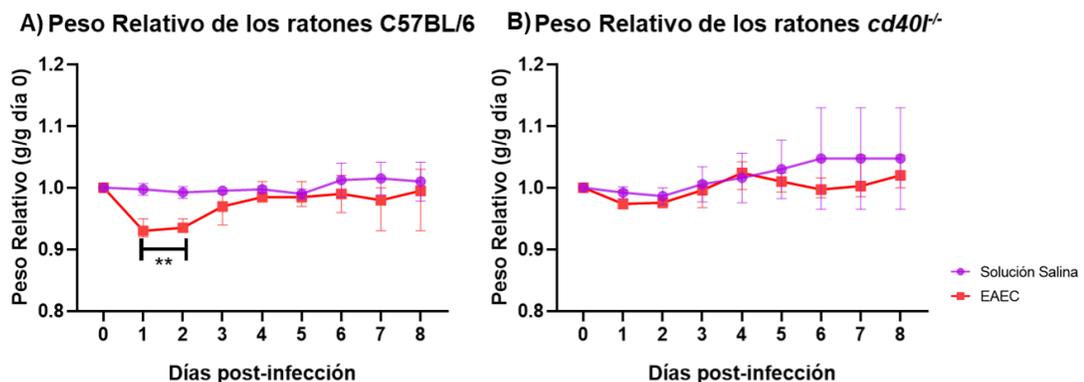
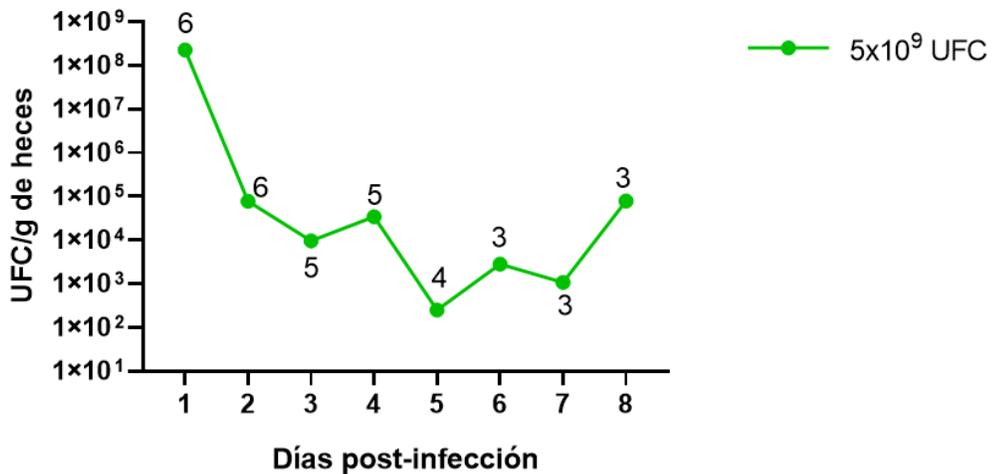


Figura 11. Los ratones C57BL/6 de 8 a 12 semanas pierden peso mientras que los *cd40l*^{-/-} no. A) Peso relativo (gramos de peso del día PI dividido entre gramos del día 0) de los ratones C57BL/6 (n= 12). B) Peso relativo de los ratones *cd40l*^{-/-} (n=9). Se usó la prueba t de Student con significancia p<0.01

En los gráficos A y B de la Figura 12, se ilustra que 5 de los 6 (83.3%) ratones silvestres estuvieron colonizados (más de tres días) y hasta el día 8, que se

detuvo el experimento, solo tres mantuvieron EAEC en las heces (Figura 12A). En contraste solo 2 ratones de los 5 (40%) ratones *cd40l^{-/-}* estuvieron colonizados al día 4 PI y para el día 8 ninguno ratón estuvo colonizado (Figura 12B).

A) Colonización de EAEC en ratones C57BL/6



Colonización de EAEC en ratones *cd40l^{-/-}*

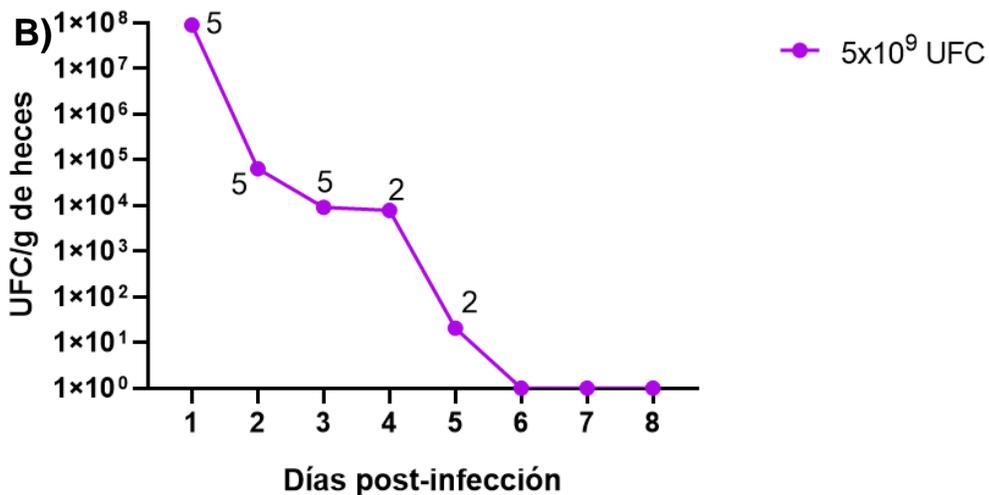


Figura 12. Los ratones C57BL/6 se mantienen colonizados hasta los 8 días PI y los *cd40l^{-/-}* hasta el día 5. A) Curva de colonización de los ratones C57BL/6 (n=6). B) Curva de colonización (promedio) de los ratones *cd40l^{-/-}* (n= 5). Los números representan la cantidad de ratones colonizados. Se realizaron 3 experimentos independientes.

Evaluación en el estado basal y tras la inoculación de EAEC de las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo

Células B totales (CD19⁺)

En el bazo de los ratones *cd40l^{-/-}* en comparación con los ratones silvestres, observamos que las células B totales al día 0 se encuentran incrementados, tanto los números totales de células como el porcentaje, el cual también está incrementado a los 8 días PI, este porcentaje es significativamente mayor con respecto al porcentaje del día 0 (Figura 13).

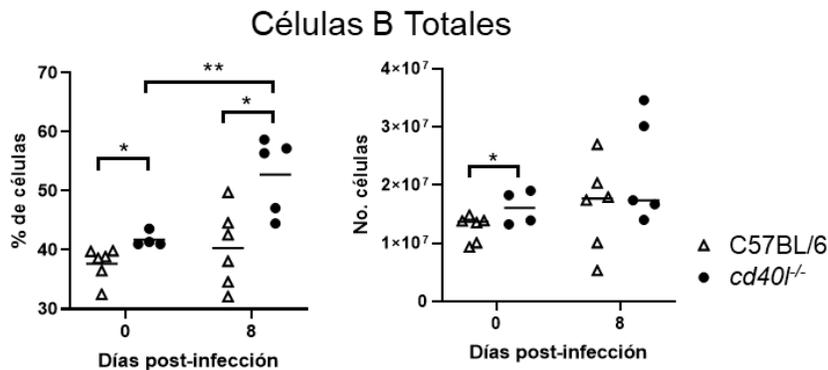


Figura 13. Porcentaje y números absolutos de células B totales en el bazo. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40l^{-/-}*. t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Células B naïve (IgM⁺ IgD⁺)

En el ratón *cd40l^{-/-}* al día 0 el ratón silvestre muestra un mayor porcentaje y número de las células B naïve (las células que no han visto al antígeno), en tanto que al día 8 no se observa ninguna diferencia en esta población. Al comparar el porcentaje de las células B naïve del ratón *cd40l^{-/-}* entre el día 0 y 8 PI se observó que esta población está significativamente disminuida en el día 8 PI (Figura 14).

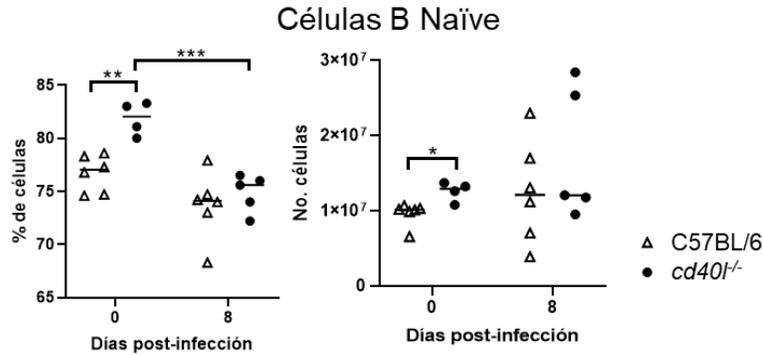


Figura 14. Porcentaje y números absolutos de células B naïve (CD19⁺ IgM⁺ IgD⁺) en el bazo. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40l^{-/-}*. t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.00. Citometría de flujo.

Células B activadas (IgM⁺ IgD⁻)

Como se muestra en la figura 15, las células B activadas (las que pierden el marcador IgD) entre las cepas de ratones, *cd40l^{-/-}* vs. el silvestre, mostró un incremento en el porcentaje de estas células al día 0 y 8 PI y en este último día también hubo un mayor número (p<0.05) de células activadas. La comparación entre el porcentaje de células B activadas del ratón *cd40l^{-/-}* entre el día 0 y 8 PI mostró un incremento (p<0.05) al día 8 PI; mientras que en esta misma comparación en el ratón silvestre al día 8 PI se observó una disminución significativa en el porcentaje de las B activadas.

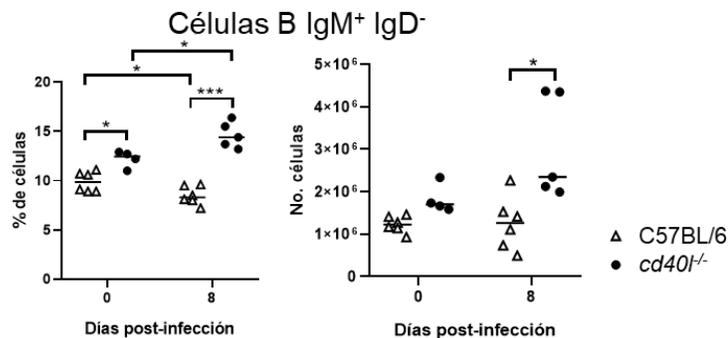


Figura 15. Porcentaje y números absolutos de células B activadas (CD19⁺ IgM⁺ IgD⁻) en el bazo. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40l^{-/-}*. t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Células B doble negativas (IgM⁻ IgD⁻)

La comparación de las células B dobles negativas (las que pierden los marcadores IgM e IgD) entre el ratón *cd40*^{-/-} vs. el silvestre a los días 0 y 8 PI revelo un porcentaje menor ($p < 0.05$) en el ratón deficiente. Como se ilustra en la figura 16, al comparar entre la misma cepa de ratón las células B dobles negativas a los días 0 y 8 PI, el número y porcentaje de estas células en el ratón *cd40*^{-/-} fueron significativamente mayores al día 8 y en ratón silvestre tanto el porcentaje ($p < 0.05$) como el número total ($p < 0.01$) de células B dobles negativas fueron mayores (Figura 16).

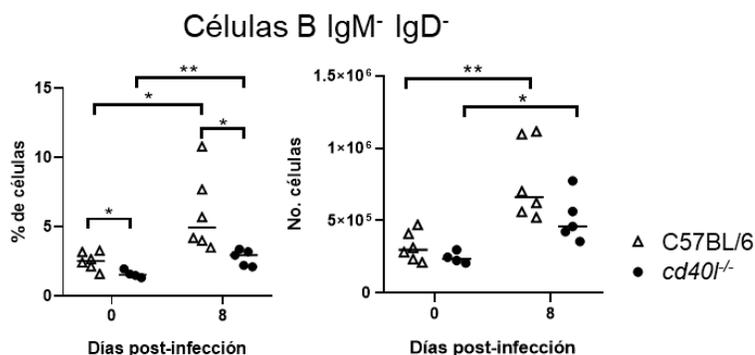


Figura 16. Porcentaje y números absolutos de células B dobles negativas (CD19⁺ IgM⁻ IgD⁻) en el bazo. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40*^{-/-}. t de student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. Citometría de flujo.

Células B IgA positivas

En el ratón *cd40*^{-/-} vs. el silvestre al día 0 y 8 PI las células B IgA⁺ al día 0 mostraron incremento significativo tanto en el porcentaje como en el número de células totales y al día 8 solo un incremento ($p < 0.01$) en el número de células totales (Figura 17).

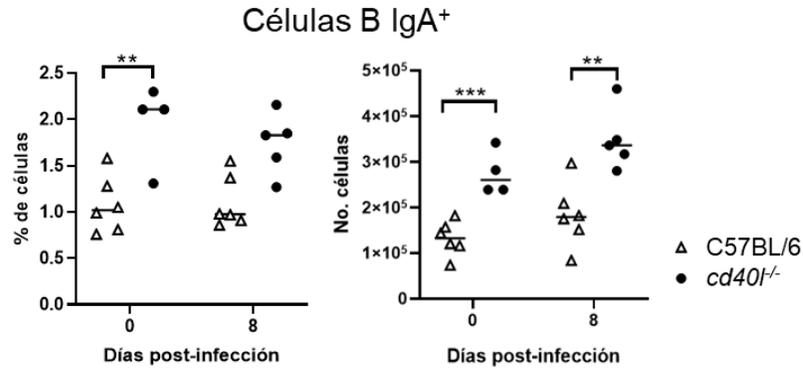


Figura 17. Porcentaje y números absolutos de células B IgA⁺ (CD19⁺ IgA⁺) en el bazo. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40l^{-/-}*. t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Células Plasmáticas Totales (CD19⁻ CD138⁺)

Por último, las células plasmáticas entre ambas cepas de ratones al día 0 no presentaron diferencias significativas. No obstante, al día 8 PI en el ratón *cd40l^{-/-}* encontramos un número de células plasmáticas significativamente mayor en comparación con el ratón silvestre. Al evaluar el día 0 vs. el día 8 PI en el ratón *cd40l^{-/-}* se observó en el número de células plasmáticas un incremento significativo al día 8 PI (Figura 18).

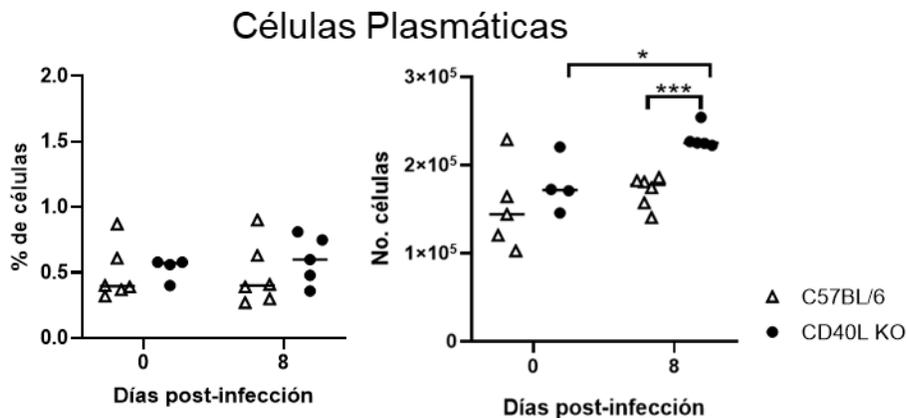


Figura 18. Porcentaje y números absolutos de células plasmáticas (CD19⁻ CD138⁺). Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40l^{-/-}*. t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Evaluación en el estado basal y tras la inoculación de EAEC de las poblaciones de células B y células plasmáticas en las PP

A continuación, se describen solo los experimentos en donde se observaron diferencias significativas entre las poblaciones ya sea entre cepas de ratón, entre la misma cepa de ratón y entre el tiempo 0 y 8 días PI.

Células B totales

La comparación de las células B totales en las PP entre los ratones *cd40^{-/-}* y el silvestre no mostró diferencias significativas ni en el porcentaje y en el número de células ni a tiempo 0 u 8 días PI (Figura 19).

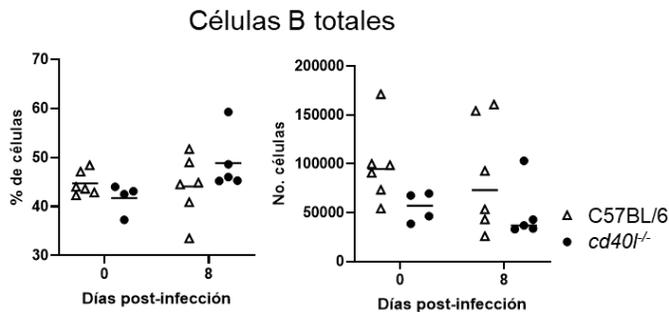


Figura 19. Porcentaje y números absolutos de células B (CD19⁺) en la placa de Peyer. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 (C57BL/6 *cd40^{-/-}*). t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Células B naïve

Como se muestra en la figura 20, el porcentaje de las células B naïve en la PP del ratón *cd40^{-/-}* comparado con el silvestre fueron significativamente mayores tanto al día 0 como al día 8 PI.

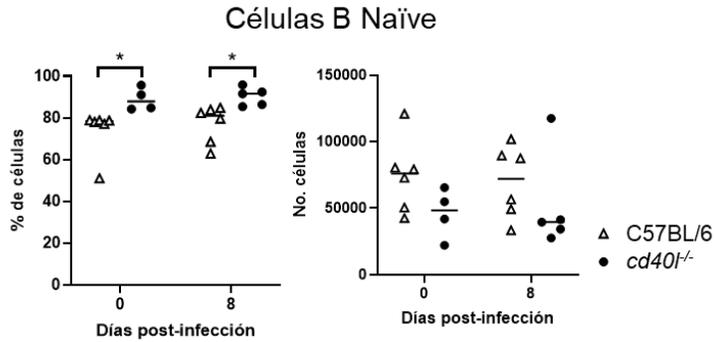


Figura 20. Porcentaje y números absolutos de células B naïve (CD19⁺ IgM⁺ IgD⁺) en la placa de Peyer. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 (C57BL/6 *cd40*^{-/-}). t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Células B activadas

Las células B activadas en el ratón *cd40*^{-/-} vs. el ratón silvestre mostraron que al día 8 PI hay un menor número (p<0.05) de células B activadas (Figura 21). Además, el ratón silvestre tuvo un porcentaje significativamente mayor a los 8 días PI al comparar con el estado basal.

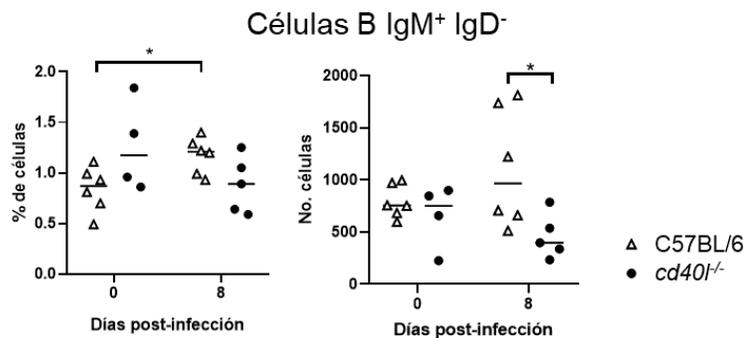


Figura 21. Porcentaje y números absolutos de células B activadas (CD19⁺ IgM⁺ IgD⁻) en la placa de Peyer. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 (C57BL/6 *cd40*^{-/-}). t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Células B dobles negativas

Como se ilustra en la figura 22, las células B dobles negativas ($IgM^- IgD^-$) del ratón $cd40l^{-/-}$ comparado con el silvestre al día 0 y 8 PI revela que en el porcentaje y el número de células disminuyen significativa. En el ratón silvestre la comparación de las dobles negativas del día 0 vs. el día 8 PI muestra un menor porcentaje ($p < 0.001$) al día 8 PI.

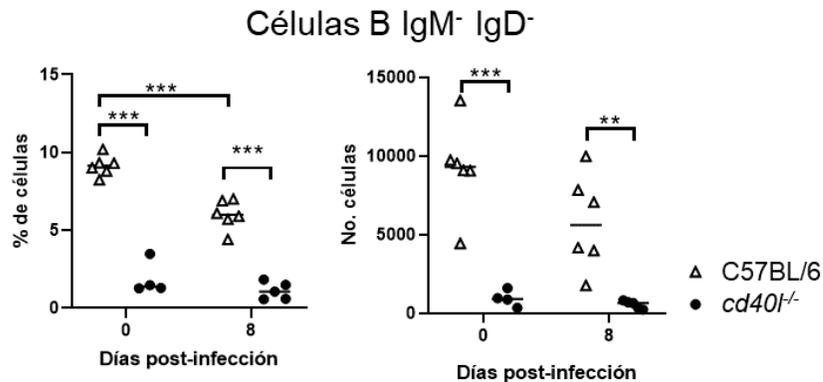


Figura 22. Porcentaje y números absolutos de células B dobles negativas ($CD19^+ IgM^- IgD^-$) en la placa de Peyer. Tres experimentos independientes. $n=6$ día 0 y día 8 C57BL/6. $n=4$ día 0, $n=5$ día 8 (C57BL/6 $cd40l^{-/-}$). t de student * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. Citometría de flujo.

Células B IgA positivas

En el ratón $cd40l^{-/-}$ el porcentaje de las células B IgA^+ en la PP fueron significativamente mayores al día 8 PI vs. el silvestre, también se observó que el porcentaje de estas células incremento ($p < 0.001$) entre el día 0 y 8 PI en el ratón $cd40l^{-/-}$ (Figura 23).

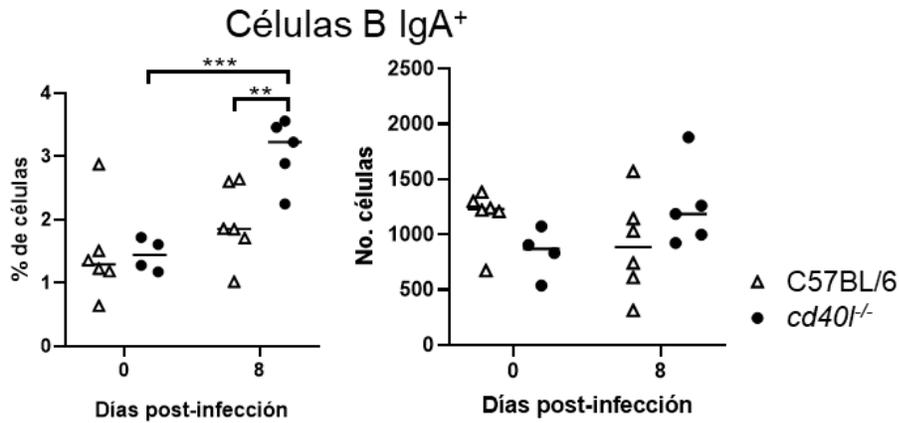


Figura 23. Porcentaje y números absolutos de células B IgA positivas (CD19⁺ IgA⁺) en la placa de Peyer. Tres experimentos independientes. n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 (C57BL/6 *cd40*^{-/-}). t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Células plasmáticas totales

Las células plasmáticas de la PP entre las cepas de ratón no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, en el ratón *cd40*^{-/-} las células plasmáticas incrementaron al día 8 PI en comparación con el día 0 (Figura 24).

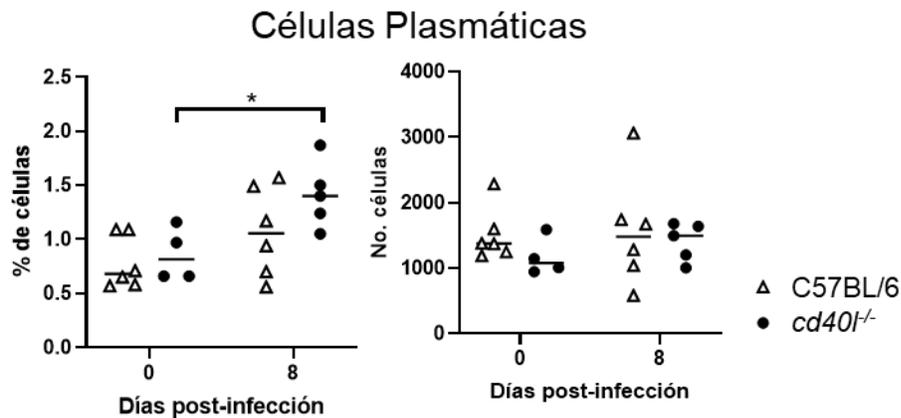


Figura 24. Porcentaje y números absolutos de células plasmáticas (CD19⁻ CD138⁺) en PP. Tres experimentos independientes, n=6 día 0 y día 8 C57BL/6. n=4 día 0, n=5 día 8 *cd40*^{-/-}. t de student *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Citometría de flujo.

Comparación entre las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo y la placa de Peyer del ratón *cd40l^{-/-}* en comparación con el ratón silvestre

En el estado basal

Como se ilustra en la tabla 2, el bazo del ratón *cd40l^{-/-}* vs. el del ratón silvestre mostró varios incrementos significativos en varias poblaciones de células B, pero no con respecto a las células plasmáticas. Mientras que las PP (*cd40l^{-/-}*) mostraron muy pocos cambios con respecto a las del ratón silvestre, observándose un incremento del porcentaje células B naïves y disminución tanto del porcentaje como del número de células B doble negativas.

Tabla 2. Comparación entre las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo y la placa de Peyer (ratón *cd40l^{-/-}* vs. ratón C57BL/6) en el estado basal.

Estirpe celular	Bazo		PP	
	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número
Células B totales	IN	IN	SD	SD
Células B naïve	IN	IN	IN	SD
Células B activadas (IgM ⁺ IgD ⁻)	IN	SD	SD	SD
Células B dobles negativas (IgM ⁻ IgD ⁻)	DI	SD	DI	DI
Células B IgA ⁺	IN	IN	SD	SD

IN: Incremento, DI: Disminución, SD: Sin diferencia

Día 8 PI

En el bazo del ratón *cd40l^{-/-}* en comparación con el silvestre solo las células B naïves no mostraron diferencias significativas ni en el porcentaje ni en el número de células. Las PP del ratón *cd40l^{-/-}* revelaron con respecto a las del ratón silvestre un incremento del porcentaje de células B naïves y las células B IgA⁺, así como una disminución de las células B doble negativas y las células B activadas (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo y la placa de Peyer (Ratón *cd40l^{-/-}* vs. Ratón C57BL/6) a los 8 días PI con EAEC

Estirpe celular	Bazo		PP	
	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número
Células B totales	IN	SD	SD	SD
Células B naïve	SD	SD	IN	SD
Células B activadas (IgM ⁺ IgD ⁻)	IN	IN	SD	DI
Células B dobles negativas (IgM ⁻ IgD ⁻)	DI	SD	DI	DI
Células B IgA ⁺	SD	IN	IN	SD
Células plasmáticas	SD	IN	SD	SD

IN: Incremento, DI: Disminución, SD: Sin diferencia

Día 8 PI vs. estado basal en el ratón *cd40l^{-/-}*

Al comparar entre el día 8 y el estado basal en el bazo del ratón *cd40l^{-/-}* encontramos incrementos en diversas poblaciones de células, excepto en las células B naïves, donde observamos una disminución en el porcentaje, y en las células B IgA⁺ donde no encontramos diferencias. En las PP solo observamos un incremento en el porcentaje de las células B IgA⁺ y las células plasmáticas (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación entre las poblaciones de células B y células plasmáticas en el bazo y la placa de Peyer (ratón *cd40l^{-/-}* a los 8 días PI con EAEC vs. ratón *cd40l^{-/-}* en el estado basal)

Estirpe celular	Bazo		PP	
	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número
Células B totales	IN	SD	SD	SD
Células B naïve	DI	SD	SD	SD
Células B activadas (IgM ⁺ IgD ⁻)	IN	SD	SD	SD
Células B dobles negativas (IgM ⁻ IgD ⁻)	IN	IN	SD	SD
Células B IgA ⁺	SD	SD	IN	SD
Células plasmáticas	SD	IN	IN	SD

IN: Incremento, DI: Disminución, SD: Sin diferencia

Día 8 PI vs. estado basal en el ratón silvestre

En la tabla 5 se ilustran solo los cambios observados en el ratón silvestre, donde el bazo de los ratones silvestres muestra una disminución del porcentaje de las células B activadas y un incremento tanto del porcentaje como del número de células B dobles negativas. Mientras que, en las PP del ratón silvestre al día 8 PI se observa una disminución tanto del porcentaje como del número de células B dobles negativas, así como un incremento en el porcentaje de las células B activadas.

Tabla 5. Comparación entre las poblaciones de células B en el bazo y la placa de Peyer (ratón C57BL/6 a los 8 días PI con EAEC vs. ratón C57BL/6 en el estado basal).

Estirpe celular	Bazo		PP	
	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número
Células B activadas (IgM ⁺ IgD ⁻)	DI	SD	IN	SD
Células B dobles negativas (IgM ⁻ IgD ⁻)	IN	IN	DI	SD

IN: Incremento, DI: Disminución, SD: Sin diferencia

Discusión

Las personas con HIGM presentan infecciones recurrentes y prolongadas de patógenos comunes o patógenos oportunistas en el tracto respiratorio o en el tracto digestivo (Fan *et al.*, 2022, Yazdani *et al.*, 2019, Gernez *et al.*, 2018; Agarwal *et al.*, 2013). El ratón *cd40^{f/-}* se ha propuesto como un modelo subrogado para el estudio de este síndrome ya que presenta en el suero concentraciones de anticuerpos parecido al de los pacientes con HIGM, con la IgM en concentraciones aumentadas o normales, la IgG e IgA disminuidas, así como la IgE ausente (Renshaw *et al.*, 1994). La ausencia de la interacción entre CD40-CD40L, presente constitutivamente sobre las células B y sobre las células T activadas, respectivamente, no permite una correcta activación de las células B, así como la inhibición de la proliferación, expresión de marcadores de activación y la diferenciación de estas células (Law & Grewal, 2009; Elgueta *et al.*, 2009; Kawabe *et al.*, 2011; Laman *et al.*, 2017). En el laboratorio se ha descrito que los ratones deficientes (*cd40^{f/-}*) tienen una mayor cantidad de IgA intestinal en las heces que los ratones silvestres (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013) y se han caracterizado las distintas poblaciones de células B y de células plasmáticas en el estado basal de estos ratones (Hernández-Cazares *et al.*, 2023).

Por lo que en el presente trabajo se caracterizaron y compararon las poblaciones de células B y de células plasmáticas en los ratones *cd40^{f/-}* y silvestres antes y después del reto con EAEC, utilizando el modelo de infección en ratones silvestres desarrollado en nuestro laboratorio contra esta bacteria (Moran-García *et al.*, 2022). Esto nos permite comprender que poblaciones de células B y plasmáticas se activan ante un reto con una bacteria patógena y utilizar estos hallazgos con el fin de polarizar la producción de anticuerpos contra patógenos específicos (“vacuna”) en los pacientes con HIGM.

Determinamos que la edad del ratón tanto silvestre como deficiente es importante para la infección con EAEC. El modelo del ratón silvestre de EAEC,

se desarrolló utilizando ratones 6 a 7 semanas, inoculados con 5×10^9 UFC, que permanecieron colonizados por más de 15 días. Sin embargo, en nuestro experimento los seis ratones silvestres utilizados fueron 4 de 8 semanas y 2 de 12 semanas, al día cuatro 5/6 (83.3%) ratones estaban colonizados, los 4 ratones de 8 semanas y 1 de 12 semanas, y hasta el día 8 el 50% (2 de 8 semanas y 1 de 12 semanas), día en que se sacrificaron los ratones. Además, se observó una pérdida del peso significativa en los días uno y dos; datos similares a los descritos por Moran-García *et al.* (2022) en el modelo silvestre-EAEC. Con respecto a los ratones *cd40l^{-/-}*, 4 de 12 semanas y 1 de 8 semanas (5 ratones), observamos que solo 2/5 (40%) (ambos de 12 semanas) estuvieron colonizados hasta el día 4 y al día 8 ninguno, así como no se observó pérdida de peso PI. Por lo que estos datos sugieren claramente que la edad del ratón es un factor de susceptibilidad para la colonización con bacterias como se ha demostrado en ratones y humanos (Zhang *et al.*, 2014; Claesson *et al.*, 2023). También corroboramos que la susceptibilidad a la infección en los ratones *cd40l^{-/-}* es dependiente de la dosis de inoculación y de la edad como se demostró en el modelo murino de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), una bacteria que también infecta a humanos. Los ratones de 6 a 8 semanas de edad se mantuvieron colonizados por más de 14 días con una dosis de 5×10^8 UFC, después de realizar una cinética de dosis y colonización, pero los ratones silvestres perdían ETEC a los 3 días PI (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013). Con respecto a la edad del ratón se ha descrito que la composición y el grosor de la capa mucinas que recubre al intestino disminuye con la edad (Elderman *et al.*, 2017, Sovran *et al.*, 2019; Sang *et al.*, 2023); por lo que es posible que en el ratón silvestre estas mucinas hayan disminuido. Se ha demostrado que la fimbria AFFII (Fimbria Adherente-Agregativa II) de EAEC se une a la mucina MUC-1, tanto en células renales (HEK293) e intestinales humanas (biopsias de colon humano) (Boll *et al.*, 2017; Gonyar, 2020), como en el modelo murino (Moran-García *et al.*, 2022). La falta de colonización en el ratón deficiente, también se puede explicar por la falta de la expresión de mucinas intestinales en este ratón, aunque directamente esto no se ha

evaluado, pero sabemos que se induce la expresión de las mucinas derivado de una respuesta Th1 o Th2 (Grondin *et al.*, 2020), en donde la interacción entre CD40-CD40L también participa particularmente en las Th2, especulando que la presencia de células epiteliales del intestino que expresan CD40 podrían activarse a través de la interacción CD40-CD40L con las células T activadas, como se ha demostrado en las células epiteliales del pulmón (Dugger *et al.*, 2009). Por lo que, en el ratón *cd40l^{-/-}*, la ausencia del CD40L no favorecería la producción de las mucinas, corroborado por la observación de que anticuerpos anti-CD4, que bloquean la función de las células T activadas, reducen significativamente la producción de mucinas durante la infección con *Nippostrongylus brasiliensis* (Khan *et al.*, 1995). Por lo que la ausencia del CD40L no induciría la producción de mucinas entre ellas MUC1, indispensable para la infección de EAEC en el intestino de los ratones silvestres (Moran-García *et al.*, 2022).

La evaluación de las poblaciones de las células B y de las células plasmáticas se realizó sin administrar inóculo bacteriano (basal) y a los 8 días PI con 5×10^9 UFC de EAEC. Se consideró el tiempo de 8 días PI, debido a que a los 7-8 días los primeros anticuerpos en ser producidos son los IgM (Abbas & Lichtman, 2004, Mejía-Martínez *et al.*, 2010), adicionalmente muchos de los daños generados por EAEC en el intestino de los ratones silvestres se reportaron a los 7 días (Moran-García *et al.*, 2022). Evaluamos dos OLS, las PP, asociadas al intestino, y el bazo, no asociado al intestino, para evaluar la respuesta inmune al inocular EAEC en su sitio de infección y a nivel sistémico respectivamente.

Las poblaciones de las células B y de las células plasmáticas del bazo y PP en el estado basal, es decir día 0, de ambos ratones se comportaron de manera similar a lo descrito recientemente en un estudio comparativo de células B y plasmáticas de diversos OLS con estas cepas de ratón de 6 a 8 semanas de edad (Hernández-Cazares *et al.* 2023). El bazo del ratón deficiente mostró vs. el del ratón silvestre, incrementos significativos en las

células B totales, B naïves, células B activadas y células B IgA⁺. Mientras que en la PP solo se incrementaron las células B naïves (Tabla 2). En su conjunto, estos resultados nos indican que los OLS en los ratones deficientes están llevando a cabo respuestas rápidas hacia antígenos TI particularmente en las PP, las cuales están expuestas a antígenos de la dieta y la microbiota, siendo la PP el primero OLS expuesto a estos antígenos intestinales (Komban *et al.*, 2019). Mientras que en el bazo de los ratones *cd40l*^{-/-} las poblaciones de células B se mantienen incrementadas en espera de la llegada de los antígenos para pasar al siguiente nivel de diferenciación y activación, ya que en este OLS se procesan antígenos provenientes principalmente de la sangre y que no son como en el intestino, primordialmente antígenos TI (Palm & Kleinau, 2021). También está bien establecido que en los OLS las respuestas hacia antígenos TI se llevan a cabo más rápidamente, de 3 a 5 días, en comparación con las respuestas ante antígenos TD que requieren la inducción del centro germinal y su procesamiento, requiriendo más de 7 días (MacLennan *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2006; Oracki *et al.*, 2010; Elsner & Shlomchik, 2020).

El incremento en el porcentaje de las células B naïve en los ratones *cd40l*^{-/-} en las PP, puede deberse a que no están siendo estimuladas por antígenos TD ya que en el ratón C57BL/6 son más abundantes las células B convencionales en este OLS que principalmente realizan reacciones TD y en menor proporción reacciones TI (Pillai & Cariappa, 2009; Fagarasan *et al.*, 2010; Komban *et al.*, 2019; Palm & Kleinau, 2021). Reforzando lo anterior observamos que en ratón *cd40l*^{-/-}, las PP contienen significativamente menores números y porcentajes de células dobles negativas sugiriendo que ya han realizado CI hacia antígenos TI cuyas respuestas son más rápidas, como ya se mencionó.

En el bazo en condiciones basales si encontramos diferencia significativa en las células B totales entre las dos cepas de ratones, ya que en los ratones *cd40l*^{-/-} el número y los porcentajes fueron significativamente mayores al igual que las células B naïve, las células B activadas y las células B IgA⁺, cabe

mencionar que en el bazo de estos ratones se ha mostrado también un incremento en las poblaciones de células B-1 (Hernández-Cazares *et al.*, 2023). El incremento de las células B naïve en la cepa deficiente se debe a que las células B-2 no son activadas debido a la deficiencia del CD40L y se acumulan, ya que es la principal población de células B en este órgano. En el ratón *cd40l^{-/-}* el incremento de las células B IgA⁺ en comparación con el silvestre, se debe a una respuesta contra antígenos TI de parte de las células B-2 de respuestas foliculares y también de células B-1 y de MZ que responden principalmente a antígenos TI produciendo anticuerpos de la clase IgA e IgM (Cerutti, *et al.*, 2011; Meyer-Bahlburg, 2015; Prieto & Felipe, 2017; Castro-Dopico & Clatworthy, 2019; Hand & Reboldi, 2021). También se ha demostrado que las plasmáticas IgA que han sido producidas en el bazo hacen “homing” hacia sitios efectores (Weiberg *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016) como la lámina propia y tal vez contribuyen a una mayor producción de IgA intestinal, la cual se acumula en el lumen en estos animales deficientes, ya que se ha mostrado que esta Ig es significativamente más abundante en las heces de los estos ratones vs. los silvestres (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013). Además, se ha evidenciado que el bazo participa en la inducción de la respuesta inmune contra antígenos captados en el intestino (Weiberg *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016; Hahn *et al.* 2010).

Hasta el momento en los ratones deficientes no se han evaluado las poblaciones de células B y plasmáticas en OLS post reto oral con EAEC (Tabla 3). Observamos que estas poblaciones, al igual que en el bazo del ratón *cd40l^{-/-}* a tiempo cero, incrementan con la excepción de las células B naïve como era de esperarse ya que están respondiendo a un antígeno, indicando que fueron activadas por los antígenos suministrados vía oral, como ya se ha descrito (Beier & Gebert, 1998). Estas respuestas son rápidas de 3 a 5 días una vez que vieron al antígeno, además, como ya se ha mencionado, el bazo también participa en respuestas a antígenos intestinales (Weiberg *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016; Hahn *et al.* 2010). Sin embargo, observamos en las PP del ratón *cd40l^{-/-}* muchos cambios en las poblaciones analizadas en comparación con el

estado basal, indicando primero que nada la anatomía de la respuesta inmune ya que las bacterias se inocularon oralmente. Puesto que en estado basal el único cambio que se observó fue un incremento significativo de la población de B naïves en comparación con el silvestre, mientras que al día 8 PI esta población se incrementó nuevamente, así como también las células B IgA⁺; es decir se están produciendo células que van a producir anticuerpos de la clase IgA, la principal Ig del intestino. Por otro lado, en concordancia con estos datos en los ratones deficientes disminuyeron las células B doble negativas, que lo más probable es que son ahora IgA positivas, ya que en efecto en el estado basal recientemente se demostró por nuestro grupo de trabajo que hay una mayor cantidad de células plasmáticas IgA⁺ en la zona T de las PP (Hernández-Cazares *et al.*, 2023), así como una mayor concentración de IgA en las heces (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013). También disminuyeron en las PP de los ratones deficientes las células B activadas, probablemente estas células ya se diferenciaron hacia células plasmáticas productoras tanto de IgM como IgA y migraron, como es su función, a los sitios efectores (Weiberg *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2016).

Al comparar las poblaciones de células B y plasmáticas en el bazo del ratón *cd40l^{-/-}* después y antes del reto con EAEC (día 8 PI vs. día 0), observamos numerosos cambios en el número y porcentajes de estas poblaciones asociados con una respuesta inmune contra un antígeno: menor porcentaje de B naïves, mayor porcentaje de B totales, mayor porcentaje de las B activadas (IgM⁺) y un mayor número y porcentaje de B doble negativas como de células plasmáticas. Esta respuesta contra los antígenos bacterianos en este ratón deficiente y su apropiada funcionalidad ya la hemos demostrado, al evidenciar que en efecto pueden los anticuerpos del suero tener un efecto bactericida mediada por complemento contra *Citrobacter rodentium* (Lopez-Saucedo *et al.*, 2015). El incremento en el porcentaje de las células B activadas sugiere que ante la ausencia del CD40L, la respuesta de las células B en estos ratones se polariza mayoritariamente hacia células B activadas (IgM⁺). En el bazo existen 3 poblaciones distintas de células B: células B de MZ, células B

foliculares (B-2) y las células B-1 (Zouali & Richard, 2011; Palm & Kleinau, 2021; Dirks *et al.*, 2023). Las células B de MZ son la primera línea de respuesta contra antígenos TI que llegan por torrente sanguíneo (Palm & Kleinau, 2021), además expresan en su superficie BCRs polireactivos, que pueden reconocer varios antígenos que contienen estructuras similares, producen anticuerpos rápidamente de baja afinidad y células plasmáticas de vida corta (Palm & Kleinau, 2021) y son muy sensibles a la estimulación mediada por TLRs (Palm & Kleinau, 2021). En las PP de los ratones *cd40l^{-/-}* se demostró nuevamente que en efecto hay reacciones en este OLS contra EAEC, observamos un incremento en los porcentajes de las células B IgA⁺ y las células plasmáticas a los 8 días PI, mostrando que hay respuestas contra estos antígenos, así como respuestas para la producción de células que producirán anticuerpos IgA que son las principales Igs identificadas en este ratón deficiente (Bernal-Reynaga *et al.*, 2013). Se ha demostrado al menos en el estado basal que estos ratones contienen en la PP una mayor cantidad de células plasmáticas productoras de IgA, igual número de células plasmáticas IgM, pero menos número de células plasmáticas IgG positivas (Hernández-Cazares *et al.*, 2023). Otra población de células B que pueden estar contribuyendo a la mayor producción de anticuerpos IgA específicos contra los antígenos TI en estos OLS secundarios son la células B-1, ya que se ha demostrado que en el estado basal los ratones deficientes contienen significativamente mayor número de células B-1, tanto OLS asociados al intestino como no asociados al intestino (Hernández-Cazares *et al.*, 2023). Las células B-1 principalmente se activan independientemente de las señales de las células T y los antígenos TD, algunos grupos también han demostrado su habilidad para generar respuestas inmunes T-dependientes (Rastogi *et al.*, 2022). Las células B-1 en principio secretan IgM, pero también IgA e IgG3 (Meyer-Bahlburg, 2015; Prieto & Felipe, 2017; Castro-Dopico & Clatworthy, 2019), estos anticuerpos son denominados naturales, los cuales tienen una alta reactividad contra patógenos pero baja afinidad, por lo que son los primeros anticuerpos

producidos contra patógenos en reacciones rápidas de 3 a 5 días (MacLennan *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2006; Oracki *et al.*, 2010; Elsner & Shlomchik, 2020).

Conclusión

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que los ratones deficientes si son capaces de responder a las bacterias estimulando poblaciones relacionadas con la producción de anticuerpos específicos contra antígenos TI, que pueden ser polisacáridos o antígenos proteicos con estructuras repetidas, que estos anticuerpos pueden contribuir a la neutralización de antígenos, así como a la eliminación de bacterias mediadas por complemento. Por todo lo anterior las respuestas en el intestino en estos ratones se polarizan hacia respuestas de anticuerpos IgA contra antígenos TI. Por lo que estas respuestas se podrán manipular para generar anticuerpos específicos contra patógenos para su eliminación y neutralización, para contribuir a su eliminación tanto en el intestino como en las vías respiratorias de los pacientes con HIGM, que en conjunto con las terapias ya establecidas para el tratamiento podrán mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Perspectivas

- Producir un modelo de colonización en el ratón *cd40^{f/-}*.
- Analizar la cantidad de moco intestinal producido por los ratones C57BL/6 y *cd40^{f/-}*.
- Analizar la expresión de MUC-1 en el intestino de los ratones C57BL/6 y *cd40^{f/-}*.
- Analizar las poblaciones de células B y células plasmáticas *in situ* e *in vivo* en el intestino de ratones C57BL/6 y *cd40^{f/-}* infectados con EAEC.
- Determinar y cuantificar anticuerpos de los diferentes isotipos (IgM, IgA, IgG, IgE) en el suero y en las heces de los ratones a los 4 y 8 días PI.
- Evaluación de las células B de zona marginal en el bazo de los ratones C57BL/6 y *cd40^{f/-}*.
- Determinación de las diferentes poblaciones de células B a los 4 días PI.
- Analizar la presencia de las células plasmáticas por isotipo específico.

Bibliografía

1. Abbas, K.A. y Lichtman, H.A. 2004. Inmunología celular y molecular. 5a Ed. Editorial GEA Consultoría Editorial. SAUNDERS. Elsevier Science and Elsevier Imprim. Madrid. España. 556 pp.
2. Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, Steffen R, Ericsson CD, DuPont HL. 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a Major Etiologic Agent in Traveler's Diarrhea in 3 Regions of the World. *Clinical Infectious Diseases*. 32: 1706–1709. doi:10.1086/320756.
3. Agarwal S, Mayer L. 2013. Diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in patients with primary immunodeficiency. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 11: 1050-1063.
4. Arasa J, Collado-Diaz V, Halin C. 2021. Structure and Immune Function of afferent lymphatics and their mechanistic contribution to dendritic cell and T cell trafficking. *Cells*. 10 (5): 1269.
5. Baert L, Ahmed MC, Manfroi B, Huard B. 2021. The number 13 of the family: a proliferation inducing ligand. *Curr Opin Immunol*. 71: 132-137.
6. Barone F, Patel P, Sanderson JD, Spencer J. 2009. Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-independent class switch recombination. *Mucosal Immunology*. 2 (6): 495-503.
7. Baumgarth N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*. 11: 34-46.
8. Beier R, Gebert A. 1998. Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol*. 275 (1): G130-7.
9. 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152: 50-56.
10. Blount ZD. 2015. The unexhausted potential of *E. coli*. *eLIFE*. 4: e05826. DOI: 10.7554/eLife.05826
 11. Boll EJ, Ayala-Lujan J, Szabady RL, Louissaint C, Smith RZ, Krogfelt KA, Nataro JP, Ruiz-Perez F, McCormick BA. 2017. Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence fimbriae drive inflammatory Cell Recruitment via interactions with Epithelial MUC1. *mBio*. 8: e00717-17.
 12. Bunker JJ, Bendelac A. 2018. IgA responses to microbiota. *Immunity*. 49: 211-224.
 13. Castro-Dopico T, Clatworthy MR. 2019. IgG and fcy receptors in intestinal immunity and inflammation. *Front Immunol*. 10, 805. Doi: 10.3389/fimmu.2019.00805
 14. Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B, Puga I, Chen K. 2011. Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 1238 (1): 132-144.
 15. Cerutti A, Cols M, Puga I. 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes.
 16. Cerutti A. 2008. The regulation of IgA class switching. *Nature Reviews Immunology*. 8: 421:434.
 17. Claesson R, Johansson A, Belibasakis GN. 2023. Age-related Subgingival Colonization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Parvimonas micra*- A pragmatic microbiological retrospective report. *Microorganisms*. 11 (6): 1434.
 18. Cruse JM, Lewis RE, Wang H. 2004. T cells and the Thymus en *Immunology Guidebook*. Academic Press. Pp 311-338.
 19. Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. 2009. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors*. 35 (6): 474-483.
 20. De la Morena MT, Leonard D, Torgerson TR, Cabral-Marques O, Slatter M, Aghamohammadi A, Chandra S, Murguia-Favela L, Bonilla FA,

Kanariou M, Damrongwatanasuk R, Kuo CY, Dvorak CC, Meyts I, Chan K, Kobrynski L, Kapoor N, Richter D, DiGiovanni D, Dhalla F, Farmaki E, Speckmann C, Español T, Shcherbina A, Hanson IC, Litzman J, Routes JM, Wong M, Fuleihan R, Seneviratne SL, Small TN, Janda A, Bezrodnik L, Seger R, Raccio AG, Edgar DM, Chou J, Abbott JK, Montfrans J, Gonzalez-Granado LI, Bunin N, Kutukculer N, Gray P, Gisela S, Pasic S, Aquino V, Wysocki C, Abolhassani H, Dorsey M, Cunningham-Rundles C, Knutsen AP, Sleasman J, Carvalho BTC, Condino-Neto A, Grunebaum E, Chapel H, Ochs HD, Filipovich A, Cowan M, Gennery A, Cant A, Notarangelo LD, Roifman CM. 2017. Long-term outcomes of 176 patients with X-linked hyper-IgM syndrome treated with or without hematopoietic cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol.* 139 (4): 1282-1292.

21. Dirks J, Viemann D, Beyersdorf N, Härtel C, Morbach H. 2023. Insights into B-cell ontogeny inferred from human immunology. *Eur J Immunol.* 53: 2250116 DOI: 10.1002/eji.202250116
22. Dugger K, Lowder TW, Tucker TA, Schwiebert LM. 2009. Epithelial cells as immune effector cells: The role of CD40. *Semin Immunol.* 21 (5): 289-292.
23. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler A, Rizzi M. 2014. B cell Biology: An overview. *Curr Allergy Asthma Rep.* 14: 434.
24. Elderman M, Sovran B, Hugenholtz F, Graversen K, Huijskes M, Houtsma E, Belzer C, Boekschoten M, de Vos P, Dekker J, Wells J, Faas M. 2017. The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition and immunity in relation to sex in mice. *PLoS One.* 12 (9): e0184274.
25. 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. *Immunologica Reviews.* 229: 152-172

26. Elsner RA, Shlomchik MJ. 2020. Germinal Center and Extrafollicular B cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. 53: 1136-1150
27. Eslami M, Schneider P. 2021. Function, occurrence and inhibition of different forms of BAFF. 71: 75-80.
28. Estrada-García T, Cerna JF, Pacheco-Gil L, Velázquez RF, Ochoa TJ, Torres J, DuPont HL. (2005). Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 1306–1308. doi:10.3201/eid1108.050192.
29. Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 66: 281–298. doi:10.1111/j.1574-695x.2012.01008.x
30. Fagarasan S, Shimpei K, Kanagawa O, Suzuki K. 2010. Adaptive Immune Regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol*. 28: 243-273.
31. Fan H, Huang L, Yang D, Zhang C, Zeng Q, Yin G, Lu G, Shen K. 2022. Respiratory infections in X-linked hyper-IgM syndrome with *CD40LG* mutation: a case series of seven children in China. *BMC Pediatrics*. 22: 675.
32. Fan X, Upadhyaya B, Wu L, Koh C, Santín-Durán M, Pittaluga S, Uzel G, Kleiner D, Williams E, Ma CA, Bodansky A, Oliveira JB, Edmonds P, Hornung R, Wong DW, Fayer R, Fleisher T, Heller T, Prussin C, Jain A. 2012. CD40 agonist antibody mediated improvement of chronic *Cryptosporidium* infection in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Clin Immunol*. 143 (2): 152-161.
33. Fleming A, Castro-Dopico T, Clatworthy MR. 2022. B cell class switching in the intestinal immunity in health and disease. *Scand J Immunol*. 95:e13139. doi:10.1111/sji.13139
34. Gars E, Butzmann A, Ohgami R, Balakrishna JP, O'Malley DP. 2020. The life and death of the germinal center. *Ann Diagn Pathol*. 44: 151421.

35. Gernez Y, Baker MG, Maglione PJ. 2018. Humoral immunodeficiencies: conferred risk of infections and benefits of immunoglobulin replacement therapy. *Transfusion*. 58: 3056-3064.
36. Gilliland MG, Young VB, Huffnagle GB. 2012. Gastrointestinal Microbial Ecology with Perspectives on Health and Disease en Leonard R. Johnson (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5ta edicion, Vol. 1, pp. 1119–1134. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-382026-6.00040-3.
37. Godlewski MM, Hallay N, Bierła JB, Zabielski R. Molecular mechanism of programmed cell death in the gut epithelium of neonatal piglets. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 3: 97–113, 2007.
38. Gomes TAT, Yamamoto D, Vieira MAM, Hernandez RT. 2016. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* en Alfredo G. Torres (Ed.). *Escherichia coli in the Americas*. pp. 77–96. Springer. doi:10.1007/978-3-319-45092-6_4.
39. Gonyar LA, Smith RM, Giron JA, Zachos NC, Ruiz-Perez F, Nataro JP. 2020. Aggregative Adherence Fimbriae II of Enteroadhesive *Escherichia coli* are required for adherence and barrier disruption during infection of Human Colonoids. *Infection and Immunity*. 88 (9): e00176-20.
40. Grasset EK, Chorny A, Casas-Recasens S, Gutzeit C, Bongers G, Thomsen I, Chen L, He Z, Matthews DB, Oropallo MA, Veeramreddy P, Uzzan M, Mortha A, Carrillo J, Reis BS, Ramanujam M, Sintès J, Magri G, Maglione PJ, Cunningham-Rundles C, Bram RJ, Faith J, Mehandru S, Pabst O, Cerutti A. 2020. Gut T cell-independent IgA responses to commensal bacteria require engagement of the TACI receptor on B cells. *Science Immunology*. 5: eaat7117.
41. Grondin JA, Kwon YH, Far PM, Haq S, Khan WI. 2020. Mucins in intestinal mucosal defense and inflammation: Learning from clinical and experimental studies. *Front Immunol*. 11: 2054.

42. Guerrant RL, Oriá RB, Moore SR, Oriá MO, Lima AA. 2008. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutrition Reviews*. 66: 487–505. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00082.x
43. Hahn A, Thiessen N, Pabst R, Buettner M, Bode U. 2010. Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin. *Immunology*. 129(3):427–36
44. Hand TW, Reboldi A. 2021. Production and Function of Immunoglobulin A. *Annu Rev Immunol*. 39: 695-718.
45. Hauser AE, Kerfoot SM, Haberman AM. 2010. Cellular choreography in the germinal center: new visions from in vivo imaging. *Semin Immunopathol*. 32: 239-255.
46. Hernandez-Cazares F, Maqueda-Alfaro RA, Lopez-Saucedo C, Martinez-Barnetche J, Yam-Puc JC, Estrada-Parra S, Flores-Romo L, Estrada-Garcia T. 2023. Elevated levels of enteric IgA in an unimmunised mouse modelo f Hyper IgM syndrome derived from gut-associated secondary lymph organs even in the absence of germinal centres. *Front Cell Infect Microbiol*. 13: 1172021. Doi: 10.3389/fcimb.2023.1172021
47. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. 2016. B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol*. 11 (1): 137-154.
48. Hofmann J, Greter M, Du Pasquier L, Becher B. 2010. B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution. *Trends in Immunology*. 31 (4): 144-153.
49. Huang C. 2020. Germinal Center Reaction. *Adv Exp Med Biol*. 1254: 47-53. doi: 10.1007/978-981-15-3532-1_4.
50. Huus KE, Petersen C, Finlay BB. 2021. Diversity and dynamism of IgA-microbiota interactions. *Nature Reviews Immunology*. 21: 514-525.
51. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123–140. doi:10.1038/nrmicro818.

52. Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. 2011. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Csi.* 73 (3-4): 69-78
53. Khan WI, Abe T, Ishikawa N, Nawa Y, Yoshimura K. 1995. Reduced amount of intestinal mucus by treatment with anti-CD4 antibody interferes with the spontaneous cure of *Nippostrongylus brasiliensis*-infection in mice. *Parasite Immunology.* 17 (9): 485-491.
54. Komban RJ, Strömberg A, Biram A, Cervin J, Lebrero-Fernández C, Mabbott N, Yrlid U Shulman Z, Bemark M, Lycke N. 2019. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nature Communications.* 10: 2423
55. Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. 2017. Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Critical Reviews in Immunology.* 37 (2-6): 393-443.
56. Lau AWY, Brink R. 2020. Selection in the germinal center. *Current Opinion in Immunology.* 63: 29-34.
57. Law C, Grewal IS. 2009. Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: The opportunities and challenges en Iqbal S. Grewal (Ed.). *Therapeutic Targets of the TNF Superfamily.* pp. 8–36. Springer.
58. LeBien TW, Tedder TF. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 112 (5): 1570-1580.
59. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. 2019. Structure-function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 4 (33): eaau6085. doi: 10.1126/sciimmunol.aau6085
60. Lopez-Saucedo C, Bernal-Reynaga R, Zayas-Jahuey J, Galindo-Gomez S, Shibayama M, Garcia-Galvez C, Estrada-Parra S, Estrada-Garcia T. 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 Research International.* 2015: 679850.

61. Ma DY, Clark EA. 2010. The role of CD40 and CD40L in Dendritic Cells. *Semin Immunol.* 21 (5): 265-272.
62. MacLennan ICM, Toellner K, Cunningham AF, Serre K, Sze D, Zuñiga E, Cook MC, Vinuesa CG. 2006. Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews.* 194: 8-18
63. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology.* 1 (1): 11-22
64. Makala LHC, Suzuki N, Nagasawa H. 2002. Peyer's Patches: Organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine. *Pathobiology.* 70 (2): 55-68.
65. Marinkovic D, Marinkovic T. 2020. Putative role of marginal zone B cells in pathophysiological processes. *Scand J Immunol.* 92: e12920
66. McAllister E, Jellusova J. 2021. BAFF signaling in B cell metabolism. *Current Opinion Immunology.* 71: 69-74.
67. Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and Function of the Spleen. *Nat Rev Immunol.* 5 (8): 606-616.
68. Mejía-Martínez K, Lemus-Flores C, Zambrano-Zaragoza JF. 2010. Estudio comparativo en la respuesta inmune humoral de IgM e IgE en cerdo Criollo Mexicano y comercial. *Arc zootec.* 59 (226): 177-184.
69. Meyer-Bahlburg A, 2015. B-1 cells as a source of IgA. *Ann N Y Acad Sci.* 1362: 122-131
70. Monteiro BT, Campos LC, Sircili MP, Franzolin MR, Bevilacqua LF, Nataro JP, Elias WP. 2009. The dispersin-encoding gene (aap) is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 65: 81–84. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.011.
71. Moran-García N, Lopez-Saucedo C, Becerra A, Meza-Segura M, Hernandez-Cazares F, Guerrero-Baez J, Galindo-Gomez S, Tsutsumi V, Schnoor M, Mendez-Tenorio A, Nataro JP, Estrada-Garcia T. 2022. A novel Adult murine model of typical Enteroaggregative *Escherichia*

- coli* infection reveals microbiota dysbiosis, mucus secretion, and AAF/IL-mediated expression and localization of β -catenin and expression of MUC1 in Ileum. *Front Cell Infect Microbiol.* 12:885191. doi: 10.3389/fcimb.2022.885191
72. Mörbe UM, Jørgense PB, Fenton TM, von Burg N, Riis LB, Spencer J, Agace WW. 2021. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology.* 14. 793-802.
73. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. 2006. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Current Opinion in Immunology.* 18 (3): 265-270
74. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 6: 829–831. doi:10.1097/00006454-198709000-00008.
75. Neely HR, Flajnik MF. 2016. Emergence and Evolution of Secondary Lymphoid Organs. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 32: 693-711.
76. Newberry RD, Lorenz RG. 2005. Organizing a mucosal defense. *Immunological Reviews.* 206 (1): 6-21.
77. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, and Aruffo A. 1992. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 6550.
78. Ohl L, Bernhardt G, Pabst O, Förster R. 2003. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Seminars in Immunology.* 15: 249-255.
79. Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. 2010. Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews.* 237: 140-159.
80. Pabst O, Cerovic V, Hornef M. 2016. Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota. *Trends in Immunology.* 37 (5): 287-296

81. Pabst O, Slack E. 2020. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunology*. 13: 12-21.
82. Pabst O, Slack E. 2020. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunology*. 13: 12-21.
83. Pabst O. 2012. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology*. 12: 821-832.
84. Palm AE, Kleinau S. 2021. Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity?. *Journal of Autoimmunity*. 119: 102627 <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102627>
85. Pape KA, Kouskoff V, Nemazee D, Tang HL, Cyster JG, Tze LE, Hippen KL, Behrens TW, Jenkins MK. 2003. Visualization of the genesis and fate of Isotype-switched B cells during a primary immune response. *J Exp Med*. 197 (12): 1677-1687.
86. Patzi-Vargas S, Zaidi M, Perez-Martinez I, León-Cen M, Michel-Ayala A, Chaussabel D, Estrada-Garcia T. 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 9:e003510. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003510
87. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. 131: 959-971.
88. Pillai S, Cariappa A. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*. 9: 767-777.
89. Prieto JMB, Felipe MJB. 2017. Development, phenotype, and function of non-conventional b cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 54: 38-44.
90. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. 2022. Role of B cells as antigen presenting cells. *Frontiers in Immunology*. 13: 954936.
91. Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D, Cyster JG. 2016. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science*. 352 (6287): aaf4822.

92. Renshaw BR, Fanslow III WC, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, Davidson BL, Maliszewski CR. 1994. Humoral Immune Responses in CD40 ligand-deficient Mice. *J Exp Med.* 180: 1889-1900.
93. Roco JA, Mesin K, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, Ellyard J, Shen Q, Robert PA, Cappello J, Vohra H, Zhang Y, Nowosad CR, Schiepers A, Corcoran LM, Toellner K, Polo JM, Meyer-Hermann M, Victoria GD, Vinuesa CG. 2019. Class-Switch recombination occurs infrequently in germinal centers. *Immunity.* 51: 337-350.
94. Ruddle NH, Akirav EM. 2009. Secondary Lymphoid Organs: Responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J Immunol.* 183 (4): 2205-2212.
95. Salzer U, Gimbacher B. 2021. TACI-deficiency-a complex system out of balance. *Curr Opin Immunol.* 71: 81-88.
96. Sang X, Wang Q, Ning Y, Wang H, Zhang R, Li Y, Fang B, Lv C, Zhang Y, Wang X, Ren F. 2023. Age-related mucus barrier dysfunction in mice is related to the change in Muc2 Mucin in the Colon. *Nutrients.* 15 (8): 1830.
97. Sauls RS, Taylor BN. Histology, M Cell. Updated 2021 Nov 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534232/?report=classic>
98. Schlom J, Jochems C, Gulley JL, Huang J. 2013. The role of soluble CD40L in immunosuppression. *Oncoimmunology.* 2 (1): e22546
99. Schweighoffer E, Tybulewicz VLJ. 2021. BAFF signaling in health and disease. *Current Opinion Immunology.* 71: 124-131.
100. Seikrit C, Pabst O. 2021. The immune landscape of IgA induction in the gut. *Seminars in Immunopathology.* 43: 627-637.
101. Shah I, Rahangdale A, Bhatnagar S. 2013. Liver Abscesses and Hyper IgM Syndrome. *J Family Med Prim Care.* 2 (2): 206-208.

102. Sheikh J, Czczulin JR, Harrington S, Hicks S, Henderson IR, Bouguéneq CL, Gounon P, Phillips A, Nataro JP. 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*. 110: 1329–1337. doi:10.1172/jci16172.
103. Smulski CR, Eibel H. 2018. BAFF and BAFF-Receptor in B cell selection and survival. *Frontiers in Immunology*. 9: 2285.
104. Sovran B, Hugenholtz F, Elderman M, Van Beek AA, Graversen K, Huijskes M, Boekschoten MV, Savelkoul HFJ, De Vos P, Dekker J, Wells Jm. 2019. Age-associated impairment of the mucus barrier function is associated with profound changes in microbiota and immunity. *Scientific Reports*. 9: 1437.
105. Szychala MS, Venna VR, Jandzinski M, Doran SJ, Durgan DJ, Ganesh BP, Ajami NJ, Putluri N, Graf J, Bryan RM, McCullough LD. 2018. Age-related changes in the gut microbiota influence systemic inflammation and stroke outcome. *Annals of Neurology*. 84 (1): 23-36
106. Strugnell RA, Wijburg OL. 2010. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 656-666.
107. Suchanek O, Clatworthy MR. 2023. Homeostatic role of B-1 cells in tissue immunity. *Front Immunol*. 14: 1106294.
108. Suzuki K, Ha S, Tsuji M, Fagarasan. 2007. Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in Immunology*. 19: 127-135.
109. Thomas C, Basile G, Le Deist F, Theophile D, Benkerrou M, Haddad E, Blanche S, Fischer A. 1995. Brief report: correction of X-linked hyper-IgM syndrome by allogeneic bone marrow transplantation. *The new england journal of medicine*. 333 (7): 426-429.
110. Ueda Y, Liao D, Yang K, Patel A, Kelsoe G. 2007. T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol*. 178:3593–601

111. Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F. 2014. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 10 (6): 365-373.
112. Wagner C, Bonnardel J, Da Silva C, Spinello L, Portilla CA, Tomas J, Lagier M, Chasson L, Masse M, Dalod M, Chollar-Namy A, Gorvel J, Lelouard H. 2020. Differentiation paths of Peyer's patch LysoDCs are linked to sampling site positioning, migration, and T cell priming. *Cell Reports*. 31: 107479.
113. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang J. 2020. B cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol*. 1254: 1-24.
114. 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*. 13 (10): e0205247.
115. Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliot EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. 1994. Mice Deficient for the CD40 ligand. *Immunity*. 1: 423-431.
116. Xu S, Lam K. 2020. Transmembrane activator and CAML interactor (TACI): Another potential target for immunotherapy of multiple myeloma?. *Cancers*. 12: 1045.
117. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*. 12: 517-531.
118. Yang Y, Wilson JM. 1996. CD40 Ligand-dependent T cell activation: Requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science*. 273 (5283): 1862-1864.
119. Yazdani R, Fekrvand S, Shahkarami S, Azizi G, Moazzami B, Abolhassani H, Aghamohammadi A. 2019. The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management. *Clinical Immunology*. 198: 19-30.
120. Young C, Brink R. 2021. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity*. 54: 1652-1664.

121. Yu K, Lieber MR. 2019. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 54 (4): 333-351.
122. Zhang K, Dupont A, Torow N, Gohde F, Leschner S, Lienenklaus S, Weiss S, Brinkmann MM, Kühnel M, Hnesel M, Fulde M, Hornef MW. 2014. Age-dependent Enterocyte invasion and microcolony formation by *Salmonella*. *PLoS Pathogens*. 10 (9): e1004385.
123. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM. 2016. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Reviews*. 270: 8-19.
124. Zhang Y, Li J, Zhang Y, Zhang X, Tao J. 2015. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research*. 2015: 247426.
125. Zouali M, Richard Y. 2011. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front Immunol*. 2: 63
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00063>