



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DE CD38 DURANTE LA ONTOGENIA DEL LINFOCITO B EN
DISTINTAS CEPAS DE RATONES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANDREA MORIN CONTRERAS

MÉXICO, D.F.

AÑO 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

VOCAL: Profesor: CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACIAS

SECRETARIO: Profesor: HÉCTOR ROMERO RÁMIREZ

1er. SUPLENTE: Profesor: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RÁMIREZ

2° SUPLENTE: Profesor: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DEL DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO DEL DEPARATAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUO POLITÉCNICO NACIONAL. FINANCIADO POR EL CONACYT. NÚMERO DE PROYECTO 56836.

ASESOR DEL TEMA: HÉCTOR ROMERO RÁMIREZ

SUSTENTANTE (S): ANDREA MORIN CONTRERAS

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Introducción	3
1. El proceso hematopoyético y órganos hematopoyéticos	3
2. Precursores del linfocito B	5
3. Antígenos de superficie asociados al desarrollo del linfocito B	7
4. Activación del linfocito B	9
5. Reacción de centro germinal	11
6. Cambio de Isotipo e Hipermutación Somática	12
7. Cambio de isotipo y la respuesta a través de TLR's	13
8. Señales coestimuladoras del linfocito B	14
9. Ingeniería genética de animales y el uso de animales transgénicos para el mejoramiento de la salud humana	15
Antecedentes	17
I. CD38 y su actividad enzimática	17
II. La ubicuidad de CD38 en el humano	18
III. Estructura de CD38	18
IV. CD38 y su actividad de receptor. El modelo humano	20
V. CD38 y su actividad de receptor. El modelo murino	20
VI. Interacciones en cis	22
VII. Papel de CD38 en diversas patologías	23
a. Diabetes	23

b. Leucemia Linfocítica Crónica	24
VIII. Aplicaciones terapéuticas	26
Justificación	27
Hipótesis	27
Objetivo general y objetivos particulares	27
Materiales y métodos	28
Resultados	34
1. Genotipificación o fenotipificación de las distintas cepas de ratones	34
2. Identificación de los distintos estadios de maduración del linfocito B	36
3. Expresión de CD38 durante la ontogenia del linfocito B en las distintas cepas de ratones.	51
Discusión de resultados	53
Conclusiones	57
Anexos	58
i. Anexo I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	58
ii. Anexo II. IDENTIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE MADURACIÓN Y ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA DE CD38	61
iii. Anexo III. METODOLOGÍAS EN EXTENSO	63
Referencias	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 MÉDULA ÓSEA ES EL TEJIDO LOCALIZADO ENTRE LAS TRABÉCULAS DEL HUESO ESPONJOSO	3
Fig. 2 LOCALIZACIÓN ANATOMICA DEL BAZO	4
Fig. 3 RECOMBINACIÓN DE LOS GENES DE LA IG	6
Fig. 4 TEMPORALIDAD DE LAS MOLÉCULAS DE SUPERFICIE UTILIZADAS COMO MARCADORES DE ESTADIOS DE MADURACIÓN DEL LINFOCITO B	9
Fig.5 EFECTO DE LAS CITOCINAS SECRETADAS POR EL LCT SOBRE EL LCB	13
Fig. 6 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE CD38	17
Fig. 7 ESTRUCTURA CRISTALINA CD38	19
Fig. 8 MODELO DE SEÑALIZACIÓN VÍA CD38	21
Fig. 9 MODELO DE SECRECIÓN DE INSULINA A TRAVÉS DE CD38	24
Fig.10 CD38 COMO AGENTE PATOGENICO EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA	25
FIG. 11 DISTRIBUCIÓN EN PORCENTAJE DE LAS MOLÉCULAS DE CD38 EN LOS DISTINTOS DOMINIOS DE LA MEMBRANA	25
Fig.12 UN CASETE DE RESISTENCIA A NEOMICINA ES TRASTOCADO EN EL EXÓN 6 DEL GEN QUE CODIFICA PARA LOS AMINOÁCIDOS SOLUBLES DE CADENA PESADA M DE LA INMUNOGLOBULINA.	30
FIG. 13 ESTE ALELO SE HA CARACTERIZADO POR LA AUSENCIA DE RNAM DEBIDO A UNA DELECIÓN DEL LOCUS, EL DNA GENÓMICO REMOVIDO COMPETE SOLO AL GEN QUE CODIFICA PARA EL TLR4.	30
FIG. 14 UNA INSERCIÓN DE UN CASETE DE RESISTENCIA A NEOMICINA EN EL EXÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA C3 REMUEVEN LAS SECUENCIAS QUE CODIFICAN PARA EL EXTREMO C-TERMINAL DE LA CADENA B Y EL EXTREMO N- TERMINAL PARA LA CADENA A, INCLUIDO	30

EL SITIO PARA PROCESAR LA MOLÉCULA PRO- C3.

**FIG. 15 GENOTIPIFICACIÓN DE LA CEPA B6.129S4-
C3^{TM1CRR}/J, “KNOCK OUT” DE C3** 34

**FIG. 16 GENOTIPIFICACIÓN DE LA CEPA C57BL/10SCNJ,
“KNOCK OUT” DE TLR4** 35

**Fig.17 GENOTIPIFICACIÓN DE LA CEPA B10.129S2(B6)-
IGH-6^{TM1CGN}/J, “KNOCK OUT” DE SIGM** 35

**Fig.18 FENOTIPIFICACIÓN DE RATONES “KNOCK OUT”DE
CD38** 36

**Fig.19 LA EXPRESIÓN DE TLR4 EN LCB NO ES NECESARIA
PARA EL DESARROLLO DEL MISMO A NIVEL DE MÉDULA
ÓSEA** 37

**Fig.20 EL PRODUCTO PRINCIPAL DEL SISTEMA DEL
COMPLEMENTO, C3, NO PARTICIPA EN EL DESARROLLO
DEL LCB, A NIVEL DE MÉDULA ÓSEA** 38

**Fig. 20 bis EL PRODUCTO PRINCIPAL DEL SISTEMA DEL
COMPLEMENTO, C3, NO PARTICIPA EN EL DESARROLLO
DEL LCB, A NIVEL DE MÉDULA ÓSEA** 39

**Fig. 21 LA EXPRESIÓN DE CD38 ES PRESCINDIBLE EN LAS
PRIMERAS ETAPAS DE MADURACIÓN DEL LCB EN
MÉDULA ÓSEA** 40

**Fig. 22 LA FORMA SOLUBLE DE IGM PARTICIPA EN LAS
PRIMERAS ETAPAS DE MADURACIÓN DEL LCB, SIENDO
DE VITAL IMPORTANCIA EN EL ESTADIO DE B
INMADURAS** 41

**Fig.23 LA EXPRESIÓN DE LA CINASA LYN, INVOLUCRADA
EN PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN ES PRESCINDIBLE EN
LAS PRIMERAS ETAPAS DE MADURACIÓN** 42

**Fig. 23 bis LA EXPRESIÓN DE LA CINASA LYN,
INVOLUCRADA EN PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN ES
PRESCINDIBLE EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE
MADURACIÓN** 43

**Fig.24 EL PRODUCTO DEL COMPLEMENTO, C3, PODRÍA
ESTAR PARTICIPANDO EN LOS PROCESOS DE** 44

MADURACIÓN DEL LINFOCITO B QUE OCURREN EN EL BAZO

Fig.25 LA AUSENCIA DE TLR4 SOBRE EL LCB REPERCUTE EN EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL LCB, ENCONTRANDO UNA DISMINUCIÓN DE LINFOCITOS B T1 Y LINFOCITOS B MADUROS 45

Fig. 25 bis LA AUSENCIA DE TLR4 SOBRE EL LCB REPERCUTE EN EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL LCB, ENCONTRANDO UNA DISMINUCIÓN DE LINFOCITOS B T1 Y LINFOCITOS B MADUROS 46

Fig.26 EN AUSENCIA DE CD38 HAY UNA DISMINUCIÓN APARENTE DE CÉLULAS EN EL ESTADIO DE TRANSICIONALES UNO Y DOS 47

Fig. 27 LA CINASA LYN JUEGA UN ROL IMPORTANTE EN LAS ETAPAS DE MADURACIÓN QUE OCURREN EN EL BAZO 48

Fig. 27 bis LA CINASA LYN JUEGA UN ROL IMPORTANTE EN LAS ETAPAS DE MADURACIÓN QUE OCURREN EN EL BAZO 49

Fig. 28 EN EL RATÓN “KNOCK OUT” DE LA CINASA FYN SE OBSERVA UN NÚMERO REDUCIDO DE LCB DE ZONA MARGINAL 50

Fig. 29 EN AUSENCIA DE LA FORMA SOLUBLE DE IGM LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA DE CD38 SE VE DISMINUIDA DE MANERA SIGNIFICATIVA EN MÉDULA ÓSEA. 51

Fig. 30 LA INCAPACIDAD PARA RESPONDER FRENTE A UN ESTÍMULO CON CD38 DE LAS CEPAS “KNOCK OUT” DE LYN Y FYN ES INDEPENDIENTE DE LA ABUNDANCIA DE CD38 52

Fig.31 IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTADIOS DE MADURACIÓN EN MÉDULA ÓSEA 62

Fig.32 IDENTIFICACIÓN DE ESTADIOS DE MADURACIÓN EN BAZO 63

ABREVIATURAS

LcB	Linfocito B
DC's	Células dendríticas
PI3K	Fosfatidilinositol- 3 cinasa
GPI	Glicofosfatidilinositol
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
FDC's	Células dendríticas foliculares
Macs	Macrófagos
APC	Célula presentadora de antígeno
ITAM	Motivos de activación del inmunoreceptor vía tirosina
PLCy2	Fosfolipasa gama 2
Btk	Tirosina cinasa de Bruton
BLNK	B cell linker protein
LcT	Linfocito T
TLR	Receptores tipo Toll
LPS	Lipopolisacárido
MO	Médula ósea
CR2	Receptor tipo 2 del complemento
siRNA	RNA de interferencia pequeños
miRNA	Micro RNA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTP's	Deoxirribonucleotidos trifosfato
FSC	Forward Scatter
SSC	Side Scatter

T1	Linfocitos B transicionales uno
T2	Linfocitos B transicionales dos
cADPR	Adenosin difosfato ribosa cíclica
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
CLL	Leucemia Linfocítica Crónica
PC-PLC	Fosfatidilcolina fosfolipsasa C
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína cinasa C
DM1	Diabetes mellitus tipo I
PBMC's	Células mononucleares de sangre periférica
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

INTRODUCCIÓN

1. El proceso hematopoyético y órganos hematopoyéticos

Hematopoyesis (hemat=sangre; poyesis=formación) es el término utilizado para describir la formación y desarrollo de las células sanguíneas. La diferenciación, proliferación y maduración de dichas células se lleva a cabo en el tejido hematopoyético que se encuentra principalmente en la médula ósea. (Ramírez, 2004)

El proceso hematopoyético comienza en el saco vitelino del embrión humano a partir de la decima novena semana después de la fertilización. Cerca del tercer mes de desarrollo embrionario, el hígado fetal se convierte en el principal sitio de producción de células sanguíneas, en este momento el proceso hematopoyético se inicia también, aunque en menor grado, en bazo, riñón y timo, esto disminuye o termina cuando la médula ósea interviene activamente en el proceso. La médula ósea se convierte en el principal tejido hematopoyético en el tercer trimestre de gestación y se mantiene como la principal fuente de producción de células sanguíneas después del nacimiento y durante la vida adulta (Carlson, 2009).

En el hueso esponjoso las láminas intersticiales se disponen de forma irregular formando unas placas llamadas trabéculas. Se conoce como médula ósea al tejido localizado entre las trabéculas del hueso esponjoso (Fig.1). Este importante tejido hematopoyético es tejido conjuntivo libre rico en células y altamente vascularizado, está compuesto por dos principales compartimientos: el hematopoyético y el vascular. El compartimiento hematopoyético es el sitio de formación y maduración de las células sanguíneas y se compone de células hematopoyéticas (elemento funcional) y de células del estroma (elemento de apoyo). Las células estromales, crean nichos con su propio microambiente que mantienen la viabilidad de las células y aporta los factores necesarios para el desarrollo de las distintas células generadas en la médula ósea. Sin embargo, la falta de características distintivas de estas células en médula ósea dificulta la identificación de nichos para varios linajes de células hematopoyéticas (Mayani, 2007; Nagasawa, 2006; McKenzie, 2000).#



Figura 1. Médula ósea es el tejido localizado entre las trabéculas del hueso esponjoso.
Modificado de ADAM, 2010

Se mencionó antes que además de la médula ósea existen otros tejidos hematopoyéticos, uno de ellos es el bazo, que, además de tener dicha función, también es un órgano linfoide secundario.

El bazo se localiza en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, bajo el diafragma y a la izquierda del estómago (Fig.2), se encuentra envuelto en una cápsula de tejido conectivo, contiene el mayor acúmulo de linfocitos y fagocitos mononucleares del cuerpo. Estas células, junto con una red reticular, están concentradas en diferentes áreas del bazo y contribuyen a la formación de tres diferentes tipos de pulpa: blanca, roja y zona marginal (Drake, 2005).

La pulpa blanca (linfocitos primarios) es una zona blanco grisácea visible que está compuesta por los nódulos linfáticos y la vaina linfática periarterial. Dentro de los nódulos existen centros germinales que consisten en una mezcla de linfocitos B, células reticulares y macrófagos fagocíticos. La pulpa blanca es donde se inicia la respuesta inmune y en algunos casos de actividad inmunitaria aumentada, la pulpa blanca podría aumentar hasta ocupar la mitad del volumen del órgano. La pulpa blanca está rodeada por una zona marginal, una red reticular que contiene vasos sanguíneos, células libres e intersticios estrechos. Esta zona se encuentra en la unión de la pulpa blanca y la pulpa roja.

Esta última contiene los senos y los cordones. Los primeros son espacios vasculares dilatados para la sangre venosa y los últimos están compuestos por acúmulo de tejido reticular y macrófagos, los cuales se localizan entre los senos (Moore,2002).



Fig. 2 Localización anatómica del bazo. ADAM, 2010

El bazo es el principal lugar en el que se producen las respuestas inmunitarias frente a los antígenos transportados en la sangre. Antígenos transportados por la sangre son forzados a establecer contacto cercano con fagocitos y linfocitos, lo cual permite la identificación del antígeno, su fagocitosis, su

presentación y la formación de anticuerpos. Tal vez la función inmunitaria del bazo es menos importante en el sistema inmune bien desarrollado del adulto que en el sistema inmune menos desarrollado del niño. Los niños pequeños en quienes se realiza esplenectomía, es decir extirpación del bazo, pueden desarrollar infecciones masivas, con frecuencia mortales, por bacterias encapsuladas, como por ejemplo, neumococos y meningococos (Abbas,2002; Quintanar, 2006; McKenzie, 2000)

2. Precursores del linfocito B

Si en la médula ósea se están formando y desarrollando todas las células de la sangre, ¿cómo es que una célula decide qué linaje tomará y qué funciones llevará a cabo? La respuesta se encuentra en los factores de crecimiento y factores de transcripción, proteínas involucradas en la comunicación celular. En ratones deficientes del factor de transcripción PAX5, el cual compromete de manera irreversible hacia el linaje de linfocito B, el desarrollo está bloqueado en la etapa de células pro-B. Estas células *Pax5*^{-/-} crecen en cocultivos con células estromales en presencia de interleucina 7 pero no se diferencian a otras células que expresen proteínas específicas del linfocito B, por lo tanto, dichas células son multipotentes (Ceredig, 2009; Dong, 2005).

Dentro de los precursores hematopoyéticos mejor caracterizados se encuentran los precursores del linfocito B.

Las células B se generan y desarrollan a partir de la célula troncal hematopoyética en la médula ósea antes de migrar a la periferia para llegar a los órganos linfoides. Es de notar que las células plasmáticas, que se originan de la activación de células B maduras en órganos linfoides periféricos, regresan para colonizar la médula ósea (LeBien, 2008).

En 1991, los precursores del linfocito B (**LcB**), definidos como célula negativas para la inmunoglobulina de superficie pero positivas para el marcador de línea celular de linfocito B, B220, fueron divididos en cuatro subgrupos de acuerdo a la expresión diferencial de marcadores de superficie. Estos cuatro subgrupos recibieron el nombre de fracciones A, B, C y D. Este orden sucesivo se sustenta en los cambios fenotípicos en la superficie celular, diferencias funcionales y al rearreglo génico de inmunoglobulina que ocurre en estas células. ¿A que nos referimos por el rearreglo génico? Bien, un linfocito B capta el antígeno a través del receptor de la célula B (BCR, por sus siglas en inglés), el cual está formado por la inmunoglobulina de membrana y las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, el repertorio de BCR's es enorme, estimado en 10^9 , este repertorio se genera a partir de recombinación de los genes del receptor para el antígeno. Tres loci codifican, respectivamente, la cadena ligera λ , la cadena ligera κ y todas las cadenas pesadas de las Ig. Cada locus se encuentra en un cromosoma diferente y cada uno de ellos se encuentra constituido por al menos tres tipos diferentes de segmentos génicos: V(regiones variables), C(regiones constantes) y J(uni6n); el locus de la IgH tiene segmentos adicionales D (diversidad). Esta recombinaci6n sucede en un orden preciso, la primera que ocurre es en el locus de la cadena pesada donde se une un segmento D y un segmento J, con deleci6n del ADN intercalado; tras esta recombinaci6n los genes V 5' se unen al complejo DJ, originado ahora un gen VDJ reordenado, cuando esta recombinaci6n ocurre en un alelo se

inhibe la recombinación en el otro (proceso llamado exclusión alélica). Si dicha recombinación es productiva se expresan los genes de la cadena pesada μ , de lo contrario se producirá la muerte de dicha célula. Este proceso ocurre solo en los precursores comprometidos al linaje. La recombinación de los genes que codifican para la cadena ligera comienza tras la expresión de los genes de la cadena pesada μ , en este caso no solo existe exclusión alélica si no que una vez que se llevó a cabo el reordenamiento V-J en una cadena κ no se dará en una cadena λ , y viceversa, si se llevó a cabo el reordenamiento en la cadena λ , se inhibe el reordenamiento de la cadena κ , a este proceso se le llama exclusión de isotipo de cadena ligera. (Fig.3)

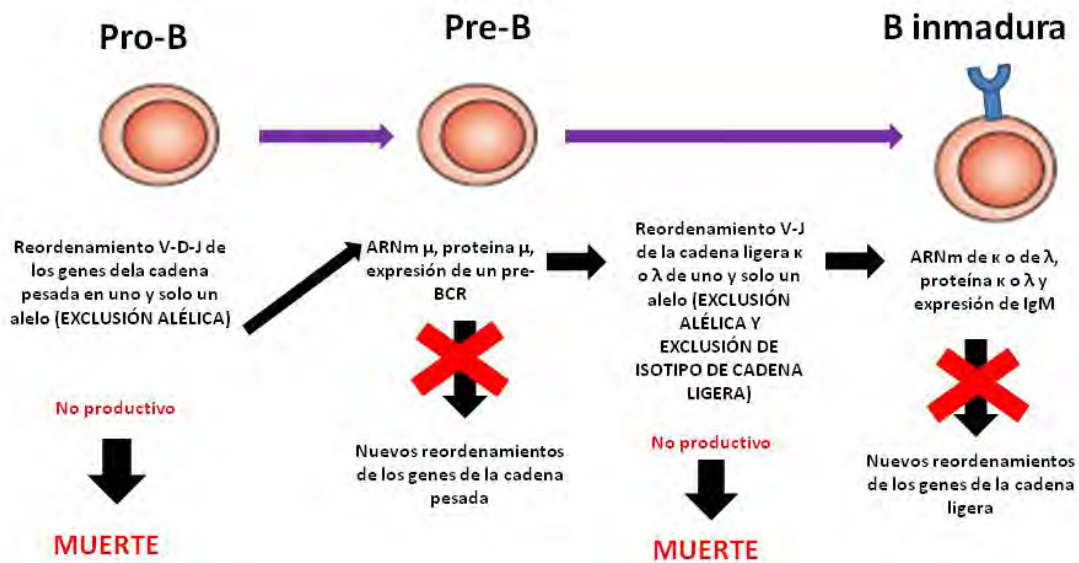


Fig. 3 Recombinación de los genes de la Ig. Modificado de Abbas,2002

Debido a que las células de la fracción A tiene el potencial de progresar a fenotipos característicos de la fracción B o C en cultivos estromales *in vitro*, se ha sugerido que esta fracción consiste de los precursores más tempranos del LcB y por ello son llamadas células pre-pro-B. Por otro lado, las fracciones B y C, consisten de células mitóticamente activas, que llevan a cabo rearrreglos DJ o VDJ de la cadena pesada y son llamadas células pro-B. La fracción D consiste principalmente de células pequeñas en reposo, llamadas pre-B y células B inmaduras, estas últimas expresan IgM de superficie pero no IgD.

Aunque se ha sugerido que las células pre-pro-B son los precursores más tempranos en el desarrollo del LcB, estudios recientes demuestran que dicha fracción es heterogénea y puede dar lugar a otros linajes hematopoyéticos además del linfocito B, tal es el caso de linfocitos T, NK y células dendríticas (DC's), incluidas las células dendríticas plasmocitoides (Nigasawa, 2006).

La célula pre-B, que solo se encuentra en tejido hematopoyético, es el primer tipo celular que sintetiza un producto génico de inmunoglobulina detectable, la cadena pesada μ citoplásmica.

La célula pre-B no expresa receptor para el antígeno unido a la membrana, ya que la expresión completa de inmunoglobulina de membrana, requiere de la síntesis de cadenas tanto pesadas como ligeras. Por consiguiente estas células no son capaces de reconocer ni responder a los antígenos. Algunas de las cadenas pesadas μ en las células pre-B se asocian a las llamadas cadenas ligeras sustitutivas, que presentan homología estructural con las cadenas ligeras κ y λ , pero que son invariables. El complejo de cadenas μ y de cadenas ligeras sustitutivas es denominado pre-BCR (Nemazee, 2000). Al igual que en el BCR maduro, el pre-BCR también se asocia a las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, que intervienen en la transducción de señales. El pre-BCR es necesario para estimular la proliferación y maduración continuada de las células B en desarrollo, pues a través de él, el linfocito B recibe señales de supervivencia.

En el siguiente estadio de maduración, la célula B en desarrollo, produce una cadena ligera κ o λ . La cadena ligera forma un complejo con la cadena pesada μ , y las moléculas de IgM ensambladas se expresan en la membrana asociadas a $Ig\alpha$ e $Ig\beta$. En esta etapa, la especificidad antigénica comienza a ser crítica en el desarrollo del LcB. Estos linfocitos B inmaduros, no proliferan ni diferencian en respuesta al antígeno, si no que su encuentro con antígenos, como los autoantígenos de la médula ósea, puede provocar la muerte celular o la falta de respuesta funcional en lugar de su activación. A este proceso se le conoce como selección negativa.

Tras el estadio de expresión de IgM, la célula co-expresa cadenas pesadas μ y δ en asociación con la cadena ligera κ o λ y, por lo tanto produce tanto IgM como IgD de membrana por medio de procesamiento alternativo de un transcrito primario de ARN mensajero. Ambas clases de inmunoglobulinas tienen la misma región variable V y por consiguiente la misma especificidad antigénica. La co-expresión de IgM e IgD conlleva a la adquisición de la competencia funcional, estas células B maduras responden a los antígenos (Abbas, 2002).

El tiempo de vida de las células B maduras parece ser enteramente dependiente de la exposición al antígeno, las células maduras que no han sido estimuladas pueden vivir solo un par de días o semanas (Vale, 2010).

3. Antígenos de superficie asociados al desarrollo del linfocito B

Podemos visualizar el desarrollo de un LcB como una secuencia de expresión diferencial de genes de inmunoglobulina así como proteínas en su superficie que sirven como marcadores de cada estadio de maduración de la célula. Dichos marcadores son CD34, CD10, CD19, CD21, CD24 y CD38. En la figura 4 se observa la temporalidad con la que dichos marcadores se expresan en el LcB.

CD34 se expresa en una pequeña proporción (1-4%) de las células presentes en médula ósea, que incluye a las células troncales hematopoyéticas. Es una glicoproteína transmembranal, altamente glicosilada, que se une a CD62L(L-selectina) y CD62E(E-selectina) y por lo tanto probablemente esté involucrada en tráfico celular.

CD10, también conocido como antígeno común de Leucemia Linfocítica Aguda. Es una glicoproteína tipo II de membrana que funciona como metaloproteínasa para regular la respuesta celular frente péptidos hormonales y citocinas (Vale, 2010).

CD19 es una glicoproteína de superficie que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se expresa exclusivamente a través del desarrollo del linfocito B, a partir de las células pro-B y excluyendo las células plasmáticas, lo cual lo convierte en el mejor marcador para enumerar linfocitos B en la clínica.

Se asocia con la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) y con la cinasa VAV. Se asocia en un complejo con CD21 (CR2), CD81(TAPA-1) y LeuB (van Zelm, 2006).

CD21 (CR2) es una proteína de superficie que tiene un pequeño dominio citoplasmático que consta de repeticiones en consenso, una tres productos de escisión de C3: iC3b, C3dg y C3d (Haas, 2005).

CD20 parece funcionar como un canal de Ca^{2+} y regula la progresión del ciclo celular. Interactúa con moléculas del MHC tanto de clase I como de clase II, así como las proteínas de cuatro dominios transmembranales (también llamadas tetraspaninas) CD43, CD81 y CD82. Parece interactuar de manera indirecta con LYN y FYN y por lo tanto modula la transducción de señales. Se expresa en células B maduras pero no en células troncales o plasmáticas. Anticuerpos dirigidos en contra de CD20, como es el caso de Rituximab®, han sido utilizados con éxito en el tratamiento de artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes (Kuijpers,2010;Edwards,2006).

CD24 es una sialoproteína unida a GPI (glicofosfatidilinositol) que sirve de ligando a P-selectina (CD62P). Su expresión disminuye en linfocitos B activados y se pierde totalmente en células plasmáticas. Este marcador puede ser usado para caracterizar el estadio del linfocito B para fines diagnósticos.

CD38 es primeramente expresado en células pre-B pero su expresión disminuye en células B inmaduras y maduras. Es una enzima bifuncional que sintetiza **cADPR** a partir de NAD e hidroliza cADPR para formar ADPR. CD38 se vuelve a expresar en linfocitos B activados y en etapas tempranas de células plasmáticas, pero se pierde nuevamente en las células plasmáticas más maduras. Se abarcará más a detalle esta molécula en la sección de antecedentes (Vale, 2010).

Estadios de maduración del LcB

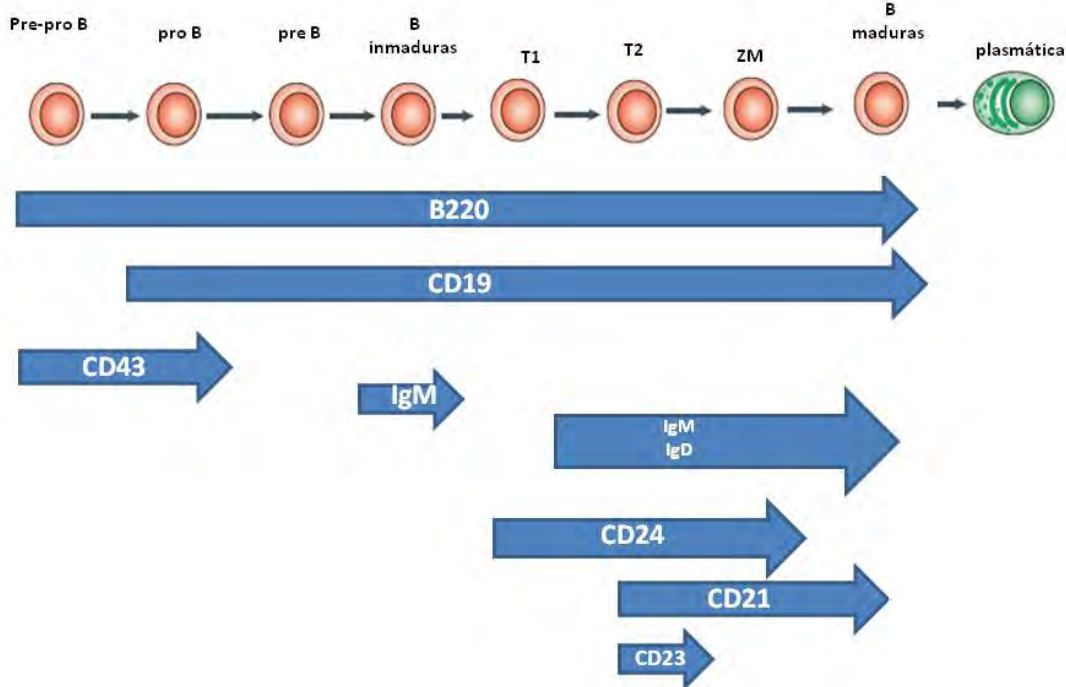


Fig. 4 Temporalidad de las moléculas de superficie utilizadas como marcadores de estadios de maduración del linfocito B. Modificado de Nagasawa, 2006

4. Activación del linfocito B

El linfocito B (LcB) es bien conocido por ser el leucocito encargado de la inmunidad mediada por anticuerpos, sin embargo para que el linfocito B produzca anticuerpos necesita ser activado.

El proceso de activación de las células B y la generación de células productoras de anticuerpos consta de fases secuenciales específicas.

De manera clásica, se ha hecho la caracterización del proceso de activación del linfocito B, a través de antígenos solubles. Sin embargo, los LcB también pueden reconocer antígenos presentados en la forma de complejos inmunes en la superficie de células dendríticas foliculares (FDC's) y recientemente se ha demostrado que el linfocito B puede reconocer y responder a los antígenos presentados en la superficie de células dendríticas (DC's) y macrófagos (Macs) (Mandels, 1980; Qi, 2006; Wykes 1998).

Los LcB tienen su encuentro con el antígeno dentro de los órganos linfoides secundarios tales como los nódulos linfáticos y el bazo concentrándose en regiones denominadas folículos linfoides, sin embargo, no

se tenía una idea clara de los mecanismos por los cuales los LcB foliculares tenían acceso a los antígenos hasta algunos trabajos publicados en el 2007. En el primero de ellos se demostró que antígenos pequeños solubles puede difundir directamente a los nódulos linfáticos a través de poros en el nódulo subcapsular (SCS, por sus siglas en inglés) para activar LcB (Pape, 2007).

En trabajos subsecuentes se identificó un nuevo rol para los macrófagos del SCS, presentando el antígeno a LcB foliculares específicos. (Depoil, 2009; Vale, 2010).

En respuesta al contacto con la célula presentadora de antígeno (APC), el linfocito B sufre considerables cambios morfológicos, caracterizados por un rápido esparcimiento sobre la superficie de la APC, seguido de una contracción. Este proceso requiere de una reorganización del citoesqueleto y la estructura que se forma como resultado de este proceso es llamada sinapsis inmunológica (IS). El antígeno es así internalizado y se agrega en pequeños microagregados iniciando la señalización por calcio. Estos microagregados pueden contener entre 100 y 500 moléculas de antígenos (Batista, 2001).

El antígeno es procesado y los péptidos son presentados en la superficie del linfocito B asociado a moléculas de clase II del MHC, y es a través de dicha asociación que puede interactuar con el linfocito T a través de su TCR. Una característica fundamental es que los linfocitos B y T que interaccionan entre sí son los que han sido estimulados por el mismo antígeno, garantizando que la respuesta que se obtiene es específica del antígeno desencadenante. El reconocimiento específico del antígeno induce la expresión de moléculas en la superficie de ambas células que mediaran una señalización bidireccional. Los LcT activados por el antígeno y la coestimulación de CD80/CD86, expresan el ligando de CD40, que al unirse con su receptor CD40, expresado de forma constitutiva en el LcB, estimula la proliferación y diferenciación de las células B. Más adelante, se hablará con mayor detalle de este proceso.

La cantidad de antígeno internalizado por el LcB dicta la cantidad de antígeno presentado a las células T y por ende determina en parte, pues no solo depende de la cantidad si no de la afinidad con la que el TCR reconocerá los péptidos en las moléculas clase II del MHC, el grado de activación que puede ser alcanzado (Depoil, 2008; Williams, 1994).

Existe también una forma de activación que es independiente de la célula T. A diferencia del LcT, que necesita que le presenten el antígeno para activarse, el LcB puede responder directamente al antígeno, siempre y cuando, dicho antígeno sea capaz de entrecruzar el BCR. Este tipo de activación puede llevar directo al cambio de isotipo, dependiendo del ambiente de citocinas. Las células B activadas de esta forma no participan en la reacción de centro germinal (Vale, 2010).

Como se mencionó antes, el BCR es un complejo formado por la inmunoglobulina de membrana y las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$. Los dominios citoplásmicos de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ contienen motivos ricos en tirosina, denominados motivos de activación del inmunoreceptor vía tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés) y que son necesarios para la transducción de señales.

Sólo minutos después del entrecruzamiento de la Ig de membrana, se produce la fosforilación de las tirosinas de los ITAMS de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ por la acción de tirosinas cinasas como Lyn. Al contacto del BCR con el antígeno, CD45 en las balsas lipídicas defosforila a la cinasa Lyn en su residuo inhibitorio, activándola,

una vez activa, la cinasa es capaz de fosforilar los residuos de tirosina de los ITAM, que a su vez sirven de muelle para el anclaje de la cinasa Syk a través de su residuo SH2. Estos eventos resultan en el reclutamiento de PLC- γ 2, Btk y BLNK, mientras que los dos primeros participan en el inicio de la señalización, los tres últimos están involucrados en propagar la señal. Todas estas moléculas en su conjunto reciben el nombre de microsignalosomas, y estos amplifican la señalización por BCR y propagan la respuesta de desparrame, que a su vez, estimula la formación de más microsignalosomas en una retroalimentación positiva. Syk activa la isoforma γ 1 de la fosfolipasa específica del fosfatidilinositol (PLC γ 1), que escinde fosfatidilinositol bifosfato(PIP₂) generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol(DAG), el primero moviliza Ca²⁺ y el segundo activa a la proteína cinasa K, que fosforila a otras proteínas. El resultado neto es la activación de factores de transcripción que inducen la expresión de genes necesarios para la activación del LcB (Weber,2008; Gauld, 2004).

Sin embargo, como todo lo vivo, la producción de anticuerpos debe tener una regulación negativa. Dicha regulación es ejercida por los mismos anticuerpos de isotipo IgG secretados, estos anticuerpos se unen con el antígeno para formar complejos antígeno-anticuerpo que se unen al receptor para la fracción Fc de IgG, denominado Fc γ RIIB, que en su dominio citoplasmático contiene un motivo de 6 aminoácidos (isoleucina-X-tirosina-X-X-leucina) que median señales inhibitorias, por lo cual recibe el nombre de motivo de inhibición del inmunoreceptor vía tirosina (ITIM). Cuando Fc γ RIIB es ocupado por los complejos antes mencionados, los residuos de ITIM son fosforilados (también por la cinasa Lyn), formando un sitio para el acoplamiento de fosfatasa como SHP-1 y SHIP, SHIP hidroliza IP₃, que como se mencionó arriba es una molécula de activación (Cornall, 1998).

5. Reacción de Centro Germinal

Los linfocitos B que fueron activados en cooperación con los linfocitos T, migran a la profundidad del folículo y comienzan a proliferar rápidamente, a esta región central del folículo de tinción más clara se le denomina centro germinal.

El centro germinal es el microambiente en el cual, tras encuentros posteriores con el antígeno, se lleva a cabo la maduración de afinidad de receptor y el cambio de isotipo. Se desarrolla solo después de la activación del linfocito B dependiente de T y su funcionalidad depende de la interacción CD40 (LcB) con CD40L(LcT).

En el modelo mürido, alrededor de la segunda semana después de la inmunización, el centro germinal madura hacia una estructura clásica compuesta de una zona oscura y una zona clara. En el centro germinal que se ha desarrollado por completo, las células en división se llaman centroblastos, mientras que las células en diferenciación se denominan centrocitos.

En la zona oscura se lleva a cabo la hipermutación somática que consiste en mutaciones puntuales de alta frecuencia en las cadenas pesadas y ligeras. En la zona clara, las células B sufren cambio de isotipo.

Las células dendríticas foliculares de los centros germinales presentan antígenos y los LcB que se unen a estos antígenos con mayor afinidad son seleccionados para sobrevivir.

Solo un pequeño número de LcB con receptor de mayor afinidad sobreviven, el resto muere por apoptosis, seguramente por falta de estimulación. En la zona clara, rodeada por una red de FDC's, el LcB se diferencia hacia células plasmáticas y células de memoria (Klein, 2008).

6. Cambio de Isotipo e Hipermutación Somática

En respuesta a la ocupación de CD40 en el linfocito B por su ligando en el linfocito T y a las citocinas que son secretadas por este último, parte de la progenie de LcB activados que expresan IgM e IgD experimentan el proceso de cambio de isotipo (clase) de cadena pesada, que conduce a la producción de anticuerpos con cadenas pesadas diferentes como γ , α , ϵ . (Fig. 5)

El principal mecanismo del cambio de isotipo es un proceso denominado recombinación genética en el que el segmento génico VDJ reordenado se recombina con un gen de la región C hacia el 3' y el ADN intercalado se elimina.

Se calcula que la tasa de mutación somática en las células B de los centros germinales es de 1 a 10^3 pares de bases de los genes V por división celular, que es 10^3 - 10^4 veces mayor que la tasa espontánea de mutación en otros genes de mamífero, motivo por el cual la mutación de los genes V de Ig se denomina también hipermutación.

Tanto la hipermutación somática (HSM) como el cambio de isotipo (CSR), son mecanismos esenciales para la generación de alta afinidad del anticuerpo por el antígeno. Ambos mecanismos moleculares dependen de las enzimas AID y UNG y deben de estar sumamente controlados, pues la introducción de mutaciones y la escisión del DNA no solo representan un riesgo respecto a la longevidad de la célula B sino que se pueden activar translocaciones y mutaciones de oncogenes. AID convierte nucleótidos de citidina en uracilo, UNG remueve el uracilo con cualquiera de los 4 nucleótidos, facilitando la HSM; la actividad de AID en sitios ricos en citidina, como lo son las regiones de cambio, permite el cambio de clase (Klein, 2008; Schwickert, 2007; Kuppers, 2001).

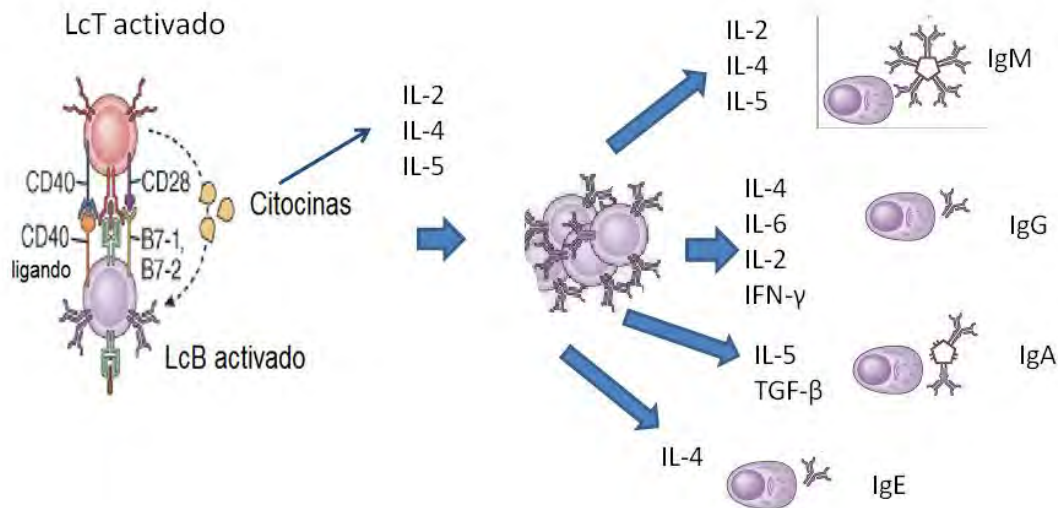


Fig.5. Efecto de las citocinas secretadas por el LcT sobre el LcB

7. Cambio de isotipo y la respuesta a través de TLR's

Los TLR reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAM's) y se expresan en una gran variedad de células del sistema inmune. Todos los TLR excepto TLR3 usan la molécula MyD88 para iniciar la cascada de señalización que activa NF- κ B y AP-1 para promover la respuesta inflamatoria.

Es bien sabido que los ligandos de TLR estimulan el cambio de clase en LcB maduros, sin embargo ahora se sabe que el cambio de clase también puede ocurrir de manera espontánea y a bajas frecuencias durante la linfopoyesis del LcB y que este cambio también puede ser inducido en respuesta a CpG y LPS.

Melamed y colaboradores (2008) estudiaron lo que sucedía con el LcB en la médula ósea y la estimulación a través de TLR, encontrando que tras estimulación de 72 horas con CpG se detectan LcB que expresan IgG en todas las fracciones y que el número de células que expresan IgG está en correlación con el grado de madurez de la célula. Sin embargo, cuando se mide la expresión de AID, la producción de transcritos de línea germinal (GST) y post switch (PST) de IgG, ambos indicadores de cambio de clase, se encuentra que el CpG aumenta la expresión de AID sin diferencia significativa entre las distintas fracciones.

Finalmente, y en concordancia con lo observado en LcB maduros, el cambio de clase en MO inducido por LPS es dirigido de C γ 2b a C γ 1 en presencia de IL-4, similarmente IL-4 dirige al LcB maduro a un cambio de clase a C γ 1 y C ϵ , mientras que IFN γ dirige el cambio de clase hacia C γ 2a y C γ 2b (Melamed, 2008).

En lo que refiere a linfocitos B maduros, Rawlings y colaboradores (2007) estimularon LcB de centro germinal de ratones inmunizados en presencia de distintos ligandos de TLR. Las células de centro germinal proliferan, de manera similar a las de zona marginal, en respuesta a LPS (lipopolisacárido), mientras que las células foliculares no lo hacen. Cuando analizaron los niveles de mRNA para MyD88 se encuentra que los valores son 4 veces mayores en centro germinal en comparación con zona marginal y foliculares maduras. En contraste, la expresión de IRAK-M, un regulador negativo de la señalización vía TLR, se redujo hasta 3 veces en centro germinal.

En conclusión, las señales de TLR están involucradas en la iniciación y potenciamiento de la respuesta inmune adaptativa, e incrementan la producción de inmunoglobulinas a través de dos mecanismos:

- Dichas señales activan directamente al LcB y promueven la producción de IgM.
- Otras células activadas por LPS (excluyendo el LcB) promueven la activación de LcT's, lo que a su vez lleva a una coestimulación del LcB (Rawlings, 2007).

8. Señales coestimuladoras en la activación del linfocito B

Además de las señales de activación antes mencionadas, el LcB puede recibir señales de activación proporcionadas por proteínas del complemento que le proporcionan una importante segunda señal para su activación. EL CR2 es un receptor para la proteína del complemento C3d, que es generada mediante proteólisis del componente esencial del complemento, C3. C3d se une mediante enlaces covalentes a los microorganismos o a los complejos antígeno-anticuerpo. Los linfocitos B pueden unirse al antígeno por medio de los receptores tipo Ig y unirse al mismo tiempo al C3d unido por medio de CR2. Esto se traduce en una amplificación de las vías de señalización iniciadas por el entrecruzamiento del BCR y así la respuesta se ve notablemente potenciada (Abbas, 2002).

El CR2 se expresa en LcB maduros en forma de un complejo compuesto de cuatro proteínas integrales de membrana: CD21/35, CD19, CD81 y CD225. Este complejo a menudo recibe el nombre de complejo correceptor del LcB. Estas moléculas que componen el complejo ejercen una influencia sobre la expresión de unas y de otras: la expresión de CD21/35 regula de manera negativa la expresión de CD19, así mismo la sobreexpresión de CD19 resulta en un descenso en la expresión de CD21/35. El incremento en la expresión de CD19 en LcB de ratones CD21/35^{-/-} tiene importantes implicaciones en autoinmunidad, pues un incremento de alrededor de 20% predispone a autoinmunidad ya que se incrementa el Lyn (endógeno) activado que desregula la tolerancia y conlleva a la producción de autoanticuerpos (Sato,2000).

En condiciones normales, CR2 no es detectado en células pre-B o células inmaduras, sino que comienza a ser detectable en células transicionales y es bien expresado en células B maduras. Sin embargo, la expresión de hCR2 (CR2 humano en ratones transgénicos) en etapas tempranas del desarrollo del LcB resulta en un bloqueo parcial del mismo y en la reducción del número de LcB maduros en 40-60% (Takahashi,1997).

En ratones hCR2^{high} se observa una marcada redistribución de células B en bazo, las células de zona marginal se expande a expensas de las transicionales y los LcB foliculares. Esta diferencia es parcialmente restituida en ratones C3^{-/-}hCR2^{high}. En dichos ratones hay un pequeño pero significativo incremento de células B en sangre periférica, los números en MO y bazo son similares a los que se encuentran en ratones C3^{+/+} hCR2^{high} (Marchbank, 2002).

El ratón C3^{-/-} posee una respuesta inmune humoral débil y defectos en la formación de centros germinales. En dichos ratones se encuentra un incremento en la expresión de mCR1/2 y mCD19.

(Towhig, 2007; Hasewaga, 2001).

#

9. Ingeniería Genética de animales y el uso de animales transgénicos para el mejoramiento de la salud humana.

La ingeniería genética de animales comenzó en 1980 y dentro de sus principales aplicaciones se encuentran:

- ✓ Obtener información de la función de los genes y su regulación, así como de enfermedades humanas.
- ✓ Obtener productos de alto valor agregado para ser usados en terapia para humanos.
- ✓ Mejorar los productos de origen animal para el consumo humano.

El ratón es por mucho el modelo experimental vertebrado más usado, dado que su genoma puede ser modificado de una forma precisa y variada.

La ingeniería genética consiste, de una manera muy generalizada, en la adición y/o reemplazamiento de genes. Para generar líneas de animales transgénicos que tengan el gene de interés en todas las células, el DNA debe de estar presente, en el embrión en la etapa de cigoto. El método más común consiste en la microinyección de DNA en el pronúcleo.

Otros métodos usados para la adición de genes incluyen: los transposones, vectores lentivirales y vectores episomales.

Por otro lado, la inhibición de un gen puede llevarse a cabo a distintos niveles:

- ✓ El gen mismo
- ✓ mRNA
- ✓ Proteína (Houdebine, 2005).

El uso de células troncales embrionarias, ha permitido el apagado o “knock out” de alrededor de 5000 genes en el ratón. La recombinación homóloga entre una secuencia genómica y DNA foráneo permite el reemplazo de cualquier región genómica. El uso más frecuente es el reemplazo de un gen activo por una versión inactiva, “knock out”, sin embargo, dicho gen también puede ser reemplazado por otro gen activo, relacionado o no con el primero. Este fenómeno conocido como “knock in”, permite evaluar la actividad biológica de diferentes alelos en su posición natural en el genoma. Sin embargo, la tasa de recombinación homóloga es baja en vertebrados, particularmente en células somáticas. Modificaciones previas al genoma, facilitan el “gen targeting”. Una posibilidad consiste en introducir el sitio de una meganucleasa, pues permiten la escisión de las dos hebras de DNA después de la adición de la enzima, este escandimiento estimula el mecanismo de reparación, lo que favorece la integración del DNA (Sauer, 1998).

Dos sistemas muy utilizados son Cre-LoxP, aislado a partir de un fago bacteriano y FLP-FRT, aislado a partir de levaduras.

La adición de LoxP o FRT, en un extremo del DNA foráneo, permite la integración específica en un sitio del genoma tan pronto las recombinasas Cre o FLP son añadidas, este proceso se ve mejorado por la adición a ambos extremos de LoxP o FRT, reduciendo los efectos no deseados de la integración aleatoria.

El gen de la recombinasa Cre puede ser expresado en un tejido dado, bajo el control de promotores específicos (Auerbach, 2003).

Por otro lado, los transgenes deben contener al menos un intrón que favorezca la maduración del pre-mRNA y la transferencia del mRNA maduro al citoplasma, no debe contener demasiadas regiones ricas en guanina y citosina, y particularmente motivos CpG en sus promotores, ya que dichas estructuras son reconocidas como extrañas y sus citosinas metiladas, inactivando de esta manera el promotor.

Estudios recientes demuestran que secuencias remotas son necesarias para que los genes sean expresados de forma correcta, estas regiones son llamadas controladoras o insuladores. Fragmentos grandes de DNA genómico (100 kb o más) tienen más posibilidades de contener insuladores que permitan la expresión apropiada del transgen o transgenes presentes (Bell, 2001).

Si hablamos de la inhibición del gen a nivel de mRNA, un descubrimiento fortuito en 1988 reveló que RNA's de doble cadena tenían la capacidad de anular el mRNA correspondiente.

El RNA de doble cadena es escindido por un complejo enzimático (DICER), en fragmentos de 21-23 pares de bases, conocidos como RNA de interferencia pequeños o siRNA (por sus siglas en inglés). Cada fragmento se asocia con un complejo proteico que escinde de manera específica la hebra sencilla de RNA

correspondiente en el citoplasma. Además de los siRNA, existen otras estructuras llamadas micro RNA o miRNA. Los miRNA maduros tiene alta homología con siRNA (Novina,2004).

Finalmente, la acción de un gen puede ser bloqueada a nivel de proteína, mediante la expresión de inhibidores específicos, tal es el caso de anticuerpos que reconocen la proteína de interés.

ANTECEDENTES

I. CD38 Y SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

CD38 es un miembro de una familia de enzimas altamente conservadas a nivel estructural, que se han encontrado en organismos diversos, tal es el caso de las babosas de mar, erizos de mar, schistosomas (especie de trematodo), aves y mamíferos. Las enzimas de esta familia se caracterizan, de otras enzimas que metabolizan nucleótidos, por su habilidad para producir adenosin difosfato ribosa cíclica (**cADPR**) a partir de dinucleótido de nicotinamida y adenina (**NAD⁺**). El cADPR induce la movilización de calcio intracelular (Lund, 2006).

En el humano funciona como una multienzima (Fig.6) que a pH neutro u alcalino, cataliza la síntesis e hidrólisis de cADPR mientras que a pH ácido cataliza la síntesis e hidrólisis de NAADP. El hecho de que el metabolismo del último dependa de condiciones ácidas, no es fortuito, si no que sugiere que el NAADP, funciona como un mensajero de Ca²⁺ específico de la vía endocítica celular (Lee, 2006).

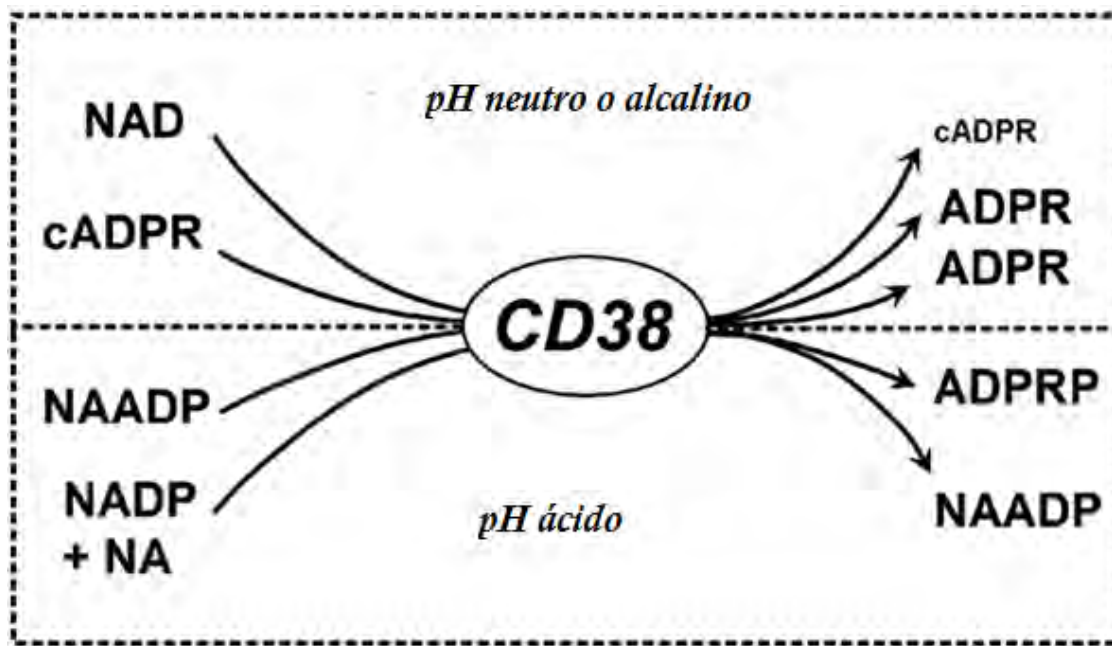


Fig. 6 Actividades enzimáticas de CD38. Lee, 2006

Ambos sustratos, NAADP y cADPR, funcionan como mensajeros de Ca^{2+} en un amplio rango de sistemas celulares que incluyen el reino protista, plantae y animal. Dentro de las funciones que regulan encontramos: fertilización, activación del linfocito T, quimiotaxis, proliferación celular, secreción de insulina, sinapsis y la respuesta al estrés en plantas (Lee, 2006).

II. LA UBICUIDAD DE CD38 EN EL HUMANO

La expresión de CD38 se observó primeramente en timocitos y linfocitos T y como sucede con muchas otras moléculas, estas primeras observaciones marcaron la dirección que futuros estudios tomarían, los cuales se enfocaron a estudiar la presencia de CD38 en tejido linfoide. Sin embargo, estudios posteriores, confirmaron la ubicuidad de CD38, al menos en el sistema inmune (Malavasi, 1994).

En circulación, las células T naïve ($CD4^+/CD45RA^+$) expresan CD38, así como un número de células T reguladoras ($CD4^+/CD25^+$), sin embargo, no se expresa o se expresa en niveles muy bajos en LcT de memoria. Dentro de la población $CD8^+$, CD38 está altamente expresado durante infecciones crónicas (LcT $CD8$ de memoria). Finalmente, la expresión de CD38 en LcT que residen en los tejidos, es dependiente de su grado de activación (Dianzani, 1994).

En un principio se pensó que los linfocitos B humanos eran $CD38^-$, sin embargo, el hecho de que células de linfomas, leucemias y mielomas expresen la molécula, pone en entre dicho esta suposición. La expresión de CD38 durante la ontogenia del linfocito B es finamente regulada. El comportamiento de la expresión es de tipo columpio, la molécula se expresa en los precursores en médula ósea, es regulada a la baja en LcB en reposo y se vuelve a expresar en células plasmáticas. (Funaro, 1999).

En lo que respecta al linaje mieloide, se ha reportado la expresión de CD38 en monocitos pero no en macrófagos residentes. Es también, un nuevo marcador de la transición de monocitos a células dendríticas, inducida por el proceso inflamatorio. Como miembros del linaje mieloide, los precursores circulantes de osteoclastos y osteoblastos expresan CD38 en su superficie, y la expresión se mantiene durante la diferenciación de estas dos poblaciones (Shalhoub, 2000). CD38 también se expresa en células del sistema inmune innato, incluyendo células NK y granulocitos, circulantes y residentes.

Fuera del tejido inmune, también se ha identificado formas funcionalmente activas de CD38 humano en la membrana externa de eritrocitos y plaquetas. CD38 también se expresa en células epiteliales prostáticas normales y células del islote pancreático. También es posible detectarla en el cuerpo y dendritas de las neuronas, en las células de Purkinje, astrocitos de ratas y terminales nerviosas. Otras células que son CD38+ incluyen células musculares, lisas y estriadas, túbulo renal, células ganglionares de retina y células de cornea (Malavasi, 2008).

III. ESTRUCTURA DE CD38 Y SU DISTRIBUCIÓN EN LA MEMBRANA

En cuanto a su estructura, esta familia de proteínas va desde la cADPR soluble de *Aplysia* de 29 kDa a las glicoproteínas de membrana de 45 kDa como CD38 y CD157. Todas estas proteínas tienen un núcleo

polipeptídico de 280-300 aminoácidos, con al menos el 25% de los residuos en común. Su secuencia de aminoácidos está muy bien conservada, en especial, la preservación de 10 residuos de cisteína y el espacio entre ellas (Malavasi, 2006).

En general, la estructura de la molécula de CD38 es en forma de “L” (Fig.7) y puede ser dividida en dos dominios. El dominio NH₂- terminal (residuos 45-118 y 144-200) está formado por un fajo de α -hélices (α 1, α 2, α 3, α 5 y α 6) y dos filamentos β pequeños (β 1, β 3), y el dominio COOH- terminal (residuos 119-143 y 201-300) consiste de 4 filamentos paralelos de hoja β (β 2, β 4, β 5 y β 6) rodeado por dos α -hélices largas (α 8 y α 9) y dos cortas (α 4 y α 7) (Malavasi, 2008).

Estudios de mutagénesis dirigida muestran que el residuo catalítico probablemente sea Glu226, pues cualquier cambio da como resultado un CD38 inactivo, el sitio activo está cargado negativamente con sus numerosos residuos ácidos, mientras que la región amino terminal, que está en contacto directo con la membrana está cargado en su mayoría positivamente, lo cual marca una interacción preferencial con fosfolípidos cargados de manera negativa (Lee, 2006).

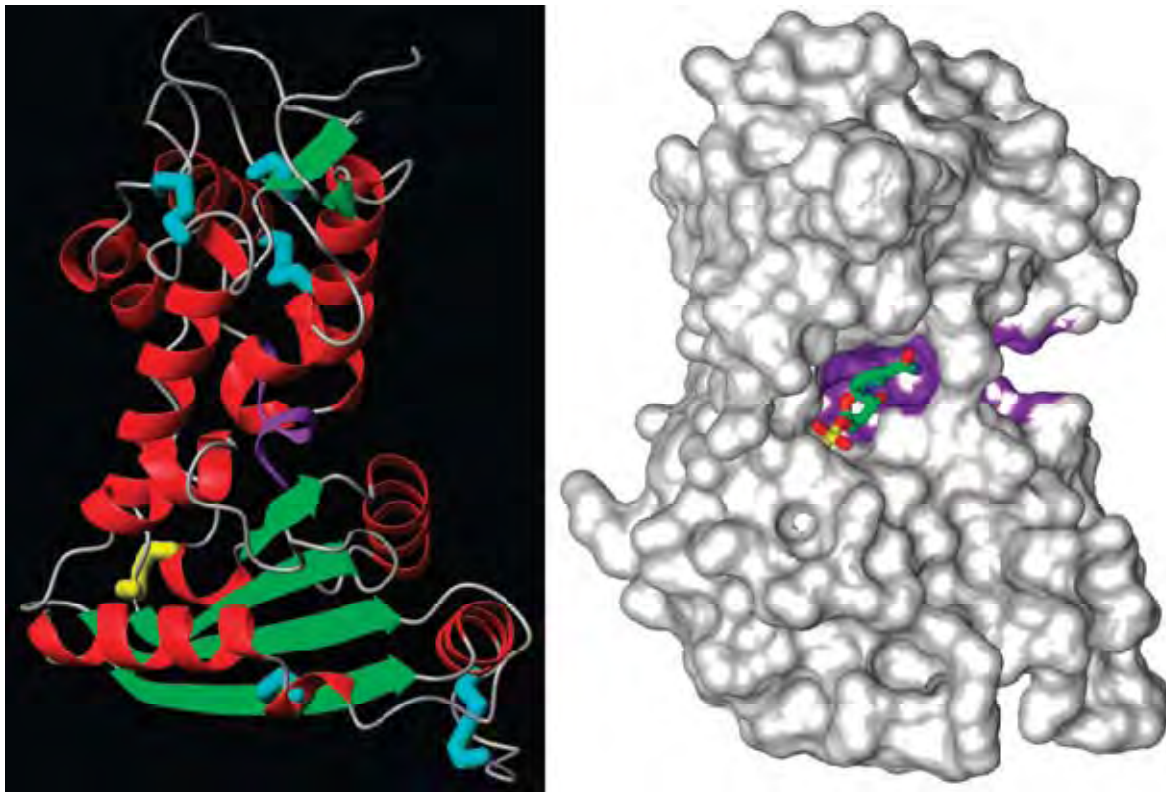


Fig. 7 Estructura cristalina de CD38. Lee, 2006

CD38 se expresa en forma de homodímeros unidos no covalentemente en la superficie de LcB murinos y funciona como co-receptor para el BCR, modulando la señalización a través de éste (Liu, 2008).

Deaglio y col. (2007) trataron la membrana de LcB normales y de distintas líneas celulares con un surfactante no iónico (Brij 98), y separando por gradiente de centrifugación 2 fracciones: una insoluble en el detergente que contenía los dominios de balsas de lípidos y una fracción soluble en el detergente, encontraron que el 50% de CD38 que se localiza en membranas insolubles, se debe a una asociación con balsas lipídicas y que los monómeros y dímeros tenían una distribución diferencial a lo largo de la membrana. En condiciones de reposo, encontraron que el 30% del monómero se hallaba en la fracción insoluble, 30% en la fracción soluble y el 40% restante en las zonas intermedias, en tanto que la distribución de dímeros fue de la siguiente manera: el 15% en la fracción insoluble y el 85% restante distribuido entre la fracción soluble y las zonas intermedias (Deaglio,2007).

IV. CD38 Y SU ACTIVIDAD DE RECEPTOR. EL MODELO HUMANO

La actividad de CD38 como receptor es regulada a través de la unión con CD31, que se expresa en células NK, plaquetas, neutrófilos y monocitos, dicha interacción induce proliferación y transformación inmunoblástica (Deaglio, 2010). Sin embargo, hasta la fecha, la interacción de CD38 con su ligando solo ha podido estudiarse a través del modelo patológico de Leucemia Linfocítica Crónica, como se verá en otro apartado de los antecedentes.

La señalización a través de CD38 está regulada por cambios conformacionales en el dominio extracelular, después de la unión con su ligando/sustrato. La re-localización de CD38 en la membrana (la translocación a las balsas lipídicas) es importante en el proceso de transducción de señales. Tras la unión con su anticuerpo, CD38 polariza hacia el área de la membrana con la mayor concentración del ganglósido GM1, el “cocaping” con CD81 (una tetraspanina residente de balsas) refuerza la observación de la localización de CD38 en balsas. CD38 y CD81 se asocian lateralmente en LcB normales y neoplásicos, dicha asociación es bidireccional. Por otro lado, también se ha demostrado la asociación de CD38 con CD19 y la inmunoglobulina de superficie en LcB normales y en aquellos derivados de Leucemia Linfocítica Crónica (CLL), dicha asociación es sensible a la depleción de colesterol indicando que la asociación ocurre en las balsas, pues la asociación CD38/CD81 también se ve afectada (Liu, 2008; Deaglio, 2007).

Además de la forma unida a membrana, se ha identificado una forma soluble de CD38 (sCD38) en sobrenadantes de cultivos de LcT activados, de varias líneas celulares tumorales, y en el suero de pacientes con mieloma y en los fluidos biológicos de pacientes con SIDA (Malavasi, 2008).

V. CD38 Y SU ACTIVIDAD DE RECEPTOR. EL MODELO MURIDO

En el 2005, Moreno- García y colaboradores lograron disecar la vía de señalización a través CD38 a tal punto que proponen el siguiente modelo: CD38, probablemente mediante una asociación con Ig α e Ig β , activa las cinasas Lyn y Fyn que a su vez activan Btk; Btk no activa la fosfolipasa C- γ 2 (PLC- γ 2), si no que participa en asociación con otras señales(posiblemente proteínas G grandes y pequeñas u otras tirosina cinasas), en la activación tanto de fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC) como de fosfolipasa D, estos eventos promueven una producción sostenida de diacilglicerol(DAG) y la consecuente activación de la proteína

cinasa K (PKC) y del factor de transcripción nuclear NF- κ B. Btk también puede contribuir de manera adicional e independiente con señales que promuevan la supervivencia celular, expresión de ciclina D2 y proliferación celular (Fig.8) (Moreno-García, 2005).

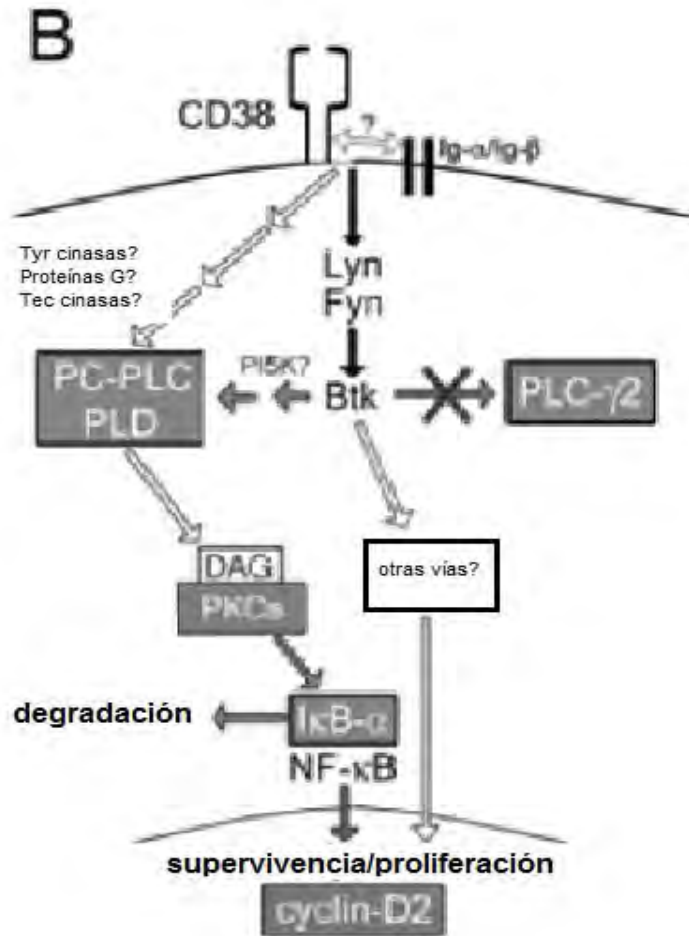


Fig. 8 Modelo de señalización vía CD38. Moreno-García,2005

El efecto de entrecruzar CD38 parece similar, pero no idéntico al efecto observado del entrecruzamiento del BCR, lo que sugiere que ambas moléculas usan una maquinaria de transducción de señales que está interrelacionada. Al entrecruzar BCRs muridos maduros con anti-CD38 en presencia de IL-4, se induce proliferación, mientras que la activación de LcB con anti-CD38 en presencia de IL-5 induce la diferenciación del LcB en células plasmáticas secretoras de IgG1.

Por otro lado, la co-estimulación de LcB con anti-CD38 y LPS, induce un aumento en la proliferación, sin embargo, solo una pequeña proporción de LcB coestimulados diferenciaran hacia células plasmáticas

CD138⁺ comparada con aquella fracción que fue solamente estimulada con el ligando de TLR. Por lo tanto, podemos concluir que las señales inducidas a través de CD38 en LcB muridos maduros favorece la proliferación a costa de la diferenciación de las mismas (Lund, 2006).

En el bazo, el número de células en el estadio de transicionales dos (T2) de ratones deficientes de CD38 se encuentra reducido, mientras el número de transicionales uno (T1) es mayor que en el ratón silvestre. Sin embargo, las células T1 no proliferan ante un estímulo con anti-CD38, por el contrario, dicho estímulo promueve la apoptosis; lo que sí ocurre es la proliferación y diferenciación de células T2 y maduras (M) a las 48 horas del estímulo, dicho efecto se ve aumentado por la adición de IL-4. Cuando se bloquea la actividad enzimática de CD38 se observa que dichas poblaciones siguen siendo capaces de proliferar, en el caso de T2 y M, o de morir (T1), ante el estímulo con anti-CD38, concluyendo que la actividad de receptor es totalmente independiente de la actividad enzimática. Para llevar a cabo la inducción de proliferación de dichas subpoblaciones, CD38 comparte ciertas moléculas de señalización que también son usadas por el BCR, tal es el caso de las cinasas Lyn, Fyn, Btk y PI3K (Rodríguez-Alba, 2005).

CD38 regula *in vivo* las funciones de otras células hematopoyéticas, incluyendo células dendríticas, monocitos y neutrófilos. De hecho, Lund y col. han demostrado que la atracción de neutrófilos hacia el sitio de inflamación es dependiente de la expresión de CD38 en dichas células y que CD38 regula la respuesta de Ca²⁺ de neutrófilos y DC's estimulados por quimiocinas, y más aún, que el tratamiento con un agonista de la cADPR, bloquea la respuesta a Ca²⁺ y el potencial quimiotáctico de dichas células. CD38 regula la quimiotaxis de las células mediante el cADPR, que controla la señalización de Ca²⁺ a través de receptores de quimiocinas (Lund, 2006; Lee, 2006).

VI. INTERACCIONES EN CIS

Dado que CD38 posee un pequeño tallo citoplásmico, que no contiene residuos de tirosina ni motivos de activación, es de esperarse que la señalización vía CD38 involucre la activación de otras moléculas asociadas a la membrana.

Se ha demostrado que tras el entrecruzamiento de CD38, la molécula es translocada a las balsas lipídicas, lo cual puede ser corroborado por experimentos de cocapping donde CD38 colocaliza con una tetraspanina residente de balsas, denominada CD81; y es en las balsas donde CD38 interactúa con CD19 formando un complejo supramolecular funcionalmente activo, pues, al parecer, en ausencia de un CD19 funcionalmente activo, CD38 es incapaz de señalizar. Dicha interacción depende de la integridad de la balsa lipídica, pues cuando el colesterol es depletado, la localización de CD38 es preferencialmente citoplásmica (Kitanaka, 1997; Deaglio, 2007).

Otro tipo de asociación es la que tiene CD38 con los receptores tipo toll (TLR's por sus siglas en inglés). Tsukamoto y colaboradores, demostraron en el 2009, que el TLR7 coopera con CD38 en combinación con IL-4 para inducir el cambio de isotipo de μ a γ 1, la producción de IgG1, un aumento en la proliferación, así como una sobreexpresión de CD86. La coestimulación de células B muridas con α CD38 + IL-4 junto con 8-mercaptoguanosina (8-SGuo, activador de TLR7), promueve la expresión tanto de

Aicda como AID, esenciales para el cambio de isotipo. Demostraron también, que la administración de 8-SGuo o Loxorribina (análogo de guanosina) en conjunto con α CD38 de forma intraperitoneal induce la diferenciación a células plasmáticas CD138⁺ y secretoras de IgG1. Por otro lado, Manjarrez-Orduño, encontró que el entrecruzamiento de CD38 junto con LPS, interfiere con la diferenciación a células plasmáticas, disminuyendo el número de células IgM⁺, y cuando se investigó el nivel de ciertos transcritos necesarios para la diferenciación notaron que, mientras que Bcl6, el cual se relaciona con el índice proliferativo, se encontraba alto, el nivel de transcritos de Blimp-1, requerido para la diferenciación, se encontraba reducido. Falta estudiar si CD38 puede promover memoria mediante la disminución de diferenciación a células plasmáticas (Tsukamoto, 2009; Manjarrez-Orduño, 2007).

VIII. PAPEL DE CD38 EN DIVERSAS PATOLOGÍAS

El primer interés en la generación de animales mutantes para CD38 surgió a partir del modelo propuesto en donde NAD⁺, debemos recordar que este es un sustrato de CD38 como enzima, es el agente central en la patogénesis del daño a células β del páncreas y el consecuente desarrollo de diabetes. Se sabe que el suero de ratones que sobre expresan CD38 muestra niveles mayores de insulina que aquellos controles en la prueba de tolerancia a glucosa, mientras que los ratones deficientes presentan intolerancia a la glucosa y su suero niveles menores de insulina comparados con los controles, más aún, los islotes pancreáticos de dichos ratones son más susceptibles a la apoptosis (Malavasi, 2008).

VII. a. DIABETES

Diversos estudios sugieren que la respuesta humoral frente CD38 puede ser seguida de destrucción de células β . Mallone (2006) propone un mecanismo fisiopatogénico de diabetes, destacando la participación de CD38: el ATP producido por el metabolismo de glucosa inhibe la actividad cADPR hidrolasa de CD38, haciendo que el cADPR se acumule, en consecuencia el Ca²⁺ se acumula y se secreta insulina (Fig. 9), en cambio las células β de ratones CD38^{-/-} no producen cADPR en respuesta a glucosa, por lo que no hay liberación de Ca²⁺ ni secreción de insulina.

Además de la participación directa de CD38, se encontraron autoanticuerpos contra CD38 en el suero de pacientes con diabetes tipo I como diabetes tipo II. La presencia de autoanticuerpos correlaciona con niveles plasmáticos mayores de péptido C e insulina. Excepto en aquellos casos de DM1 avanzados, pues en ellos, ya no hay más células β que estimular. En un estudio longitudinal retrospectivo, se analizó el suero de pacientes con DM1 al momento de diagnóstico, 2, 5 y 10 años después y se encontró que la prevalencia de autoanticuerpos aumentaba con el progreso temporal de la enfermedad. La estimulación sostenida, que se presenta con los autoanticuerpos y los altos niveles de insulina plasmática, puede llevar a que las pocas células β se agoten más rápido. En resumen, el influjo prolongado de Ca²⁺ a las células β produce desensibilización y apoptosis, más aún, los anticuerpos contra CD38 en PBMC's provocan la liberación de citocinas proinflamatorias que también contribuyen al establecimiento de diabetes (Mallone, 2006).

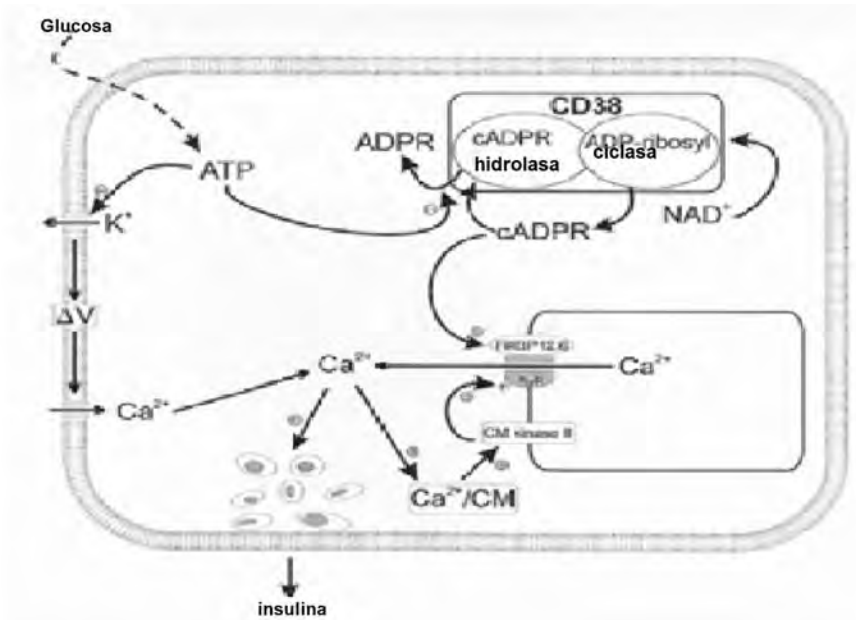


Fig.9 Modelo de secreción de insulina a través de CD38. Mallone,2006

VII. b. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

La primera observación donde se ligó la expresión de CD38 al mal pronóstico de pacientes con LLC fue publicada por el grupo de Chiorazzi y colaboradores en 1999, donde los autores sugieren que los pacientes pueden ser divididos en dos grupos de pronóstico de acuerdo a la mutación en los genes IgV. Pacientes que no tenían mutaciones en dichos genes presentaban una enfermedad más agresiva al diagnóstico, no tenían una buena respuesta a las terapias convencionales y finalmente morían más pronto; la misma población presentaba valores mayores de células CD38+. Numerosos trabajos posteriormente confirmaron la observación y ahora podemos concluir que la expresión de CD38 es un marcador de mal pronóstico en pacientes con LLC (D'Arena, 2001; Jakob, 2006).

El interés que se tiene en dicha patología deriva de la posibilidad de estudiar el rol de CD38 *in vivo* a través de dicho modelo. La hipótesis es que CD38 no solo es un marcador de mal pronóstico, si no que su expresión puede estar implicada en la patogenia de la enfermedad. En concordancia con esto, Deaglio y colaboradores, demostraron en el 2003 que el entrecruzamiento de CD38, por medio de anticuerpos monoclonales, es seguido por proliferación y transformación blástica de una subpoblación de células leucémicas. Trabajos posteriores del mismo grupo, demostraron que el contacto de CD38 con el ligando CD31 regula a la alta la expresión del receptor de supervivencia CD100, un miembro de la familia de las semaforinas involucrado en el crecimiento y supervivencia de células leucémicas (Fig.10).

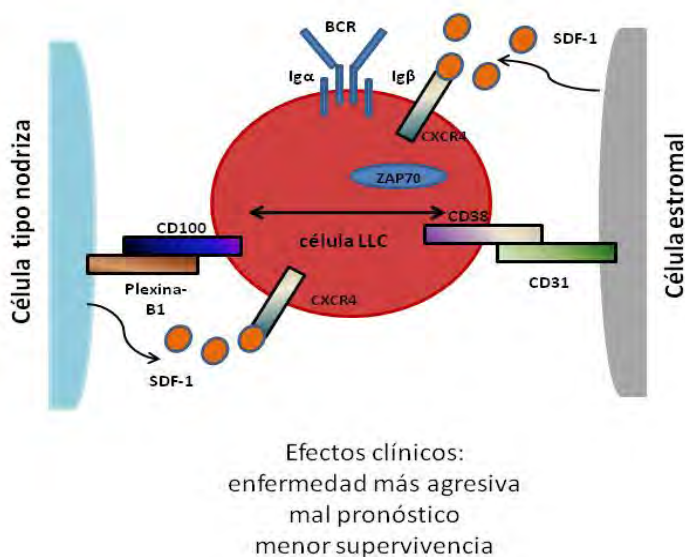


Fig. 10 CD38 como agente patogénico en Leucemia Linfocítica Crónica. Modificado de Malavasi,2008

Más aun, en un estudio más reciente, se encontró que las balsas de lípidos de líneas celulares contienen un mayor número de monómeros de CD38 que los LcB aislados de amígdalas de pacientes sanos; dichos monómeros representan una forma de la molécula que los autores definen como “ready to use”, es decir, que al unirse a CD31 comenzará la cascada de señalización que llevará a eventos de proliferación, refractoriedad a terapias convencionales y la adquisición de otros marcadores de mal pronóstico (Fig.11) (Deaglio,2003, 2005, 2007).

células	MID		Intermedia		MSD	
	Monómero	dímero	monómero	dímero	monómero	Dímero
LcB de amígdala	32	16	38	44	30	40
Nalm- 6	46	19	46	36	8	45
Raji	33	36	50	45	17	19
Daudi	34	46	60	52	6	2
DLo6	27	2	50	59	23	20

Fig. 11 Distribución en porcentaje de las moléculas de CD38 en los distintos dominios de la membrana. MID=Membrana Insoluble en Detergente, MSD=Membrana Soluble en Detergente. Deaglio,2007

VIII. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

El hecho de que CD38 se expresa en el caso de tumores linfoides, mielomas, linfomas asociados a SIDA y linfoproliferación post- trasplante, lo convierte en un blanco terapéutico promisor para la terapia con anticuerpos. Tres grupos han descrito anticuerpos anti-CD38 con un fuerte potencial citolítico. Primero, un anticuerpo monoclonal anti-CD38 de clase IgG, elaborado en ratones transgénicos, con potente citotoxicidad celular y por complemento frente líneas celulares de mieloma así como de médula ósea y sangre leucémica. Segundo, una serie de anti-hCD38 específicos, con gran afinidad y actividad **CCDA** (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) contra líneas celulares y cultivos primarios de mieloma, fueron seleccionados a partir de una biblioteca de fagos. Finalmente, para aumentar la afinidad por células de mieloma se han desarrollado anticuerpos anti-CD38/CD138. Debido a que carece de fracción Fc, esta construcción basa su citotoxicidad en proporcionar una toxina a la célula tumoral.

Existen otras neoplasias que pueden ser objeto de la terapia con anticuerpos, tales como la leucemia promielocítica aguda y otras leucemias en donde la expresión de CD38 puede ser inducida a través de tratamiento con ácido retinoico.

Sin embargo hay que tomar en cuenta las evidencias de que CD38 promueve manifestaciones pulmonares del síndrome de ácido retinoico (Stevenson, 2006).

JUSTIFICACIÓN

Durante su ontogenia, el linfocito B atraviesa una serie de etapas sucesivas donde suceden cambios en su morfología y función. Diversas moléculas participan de manera directa (de nuestro interés C3, TLR4, Fyn, Lyn, sIgM) o indirecta (CD38) en dichos cambios. El mayor número de estudios se ha realizado en células de bazo y pocos se han enfocado al estudio de la médula ósea. De ahí la importancia de estudiar qué sucede en las primeras etapas del proceso de maduración y diferenciación en ausencia de dichas moléculas (C3, TLR4, Fyn, Lyn, sIgM), así como de analizar la expresión de CD38 en estas poblaciones, pues un cambio en la expresión es sugestivo de algún tipo de relación entre CD38 y las moléculas en cuestión durante el proceso de maduración y diferenciación.

HIPÓTESIS

En ausencia de alguna de las moléculas antes mencionadas (C3, TLR4, Fyn, Lyn, sIgM) el linfocito B podría estar usando CD38 como una vía alterna en su maduración.

OBJETIVO

Analizar la expresión de CD38 durante la ontogenia del linfocito B en distintas cepas de ratones:

- ✓ C57BL/6J, cepa control para las 3 siguientes cepas
- ✓ B10.129S2(B6)-*Igh-6^{tm1Cgn}*/J, no secreta IgM
- ✓ B6.129S4-*C3^{tm1Crr}*/J, “knock out” del producto del complemento C3
- ✓ C57BL/10ScNJ, “knock out” de TLR4
- ✓ 129SvImJ, cepa control para las siguientes cepas
- ✓ Lyn^{-/-} 129SvImJ, “knock out” de la cinasa Lyn
- ✓ Fyn^{-/-} 129SvImJ, “knock out” de la cinasa Fyn

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Identificar los distintos estadios de maduración del linfocito B
- ✓ Analizar la expresión de CD38 en dichos estadios.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cepas de ratones.

Se trabajó con las siguientes cepas de ratones mantenidas en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV, Zacatenco), que a su vez, fueron adquiridas de Jackson Laboratory, EU: C57BL/6J, la cepa control, B10.129S2(B6)-*Igh-6^{tm1Cgn}*/J, esta cepa no secreta IgM, C57BL/10ScNJ, “knock out” de TLR4, B6.129S4-*C3^{tm1Crr}*/J “knock out” del producto C3 del complemento, B6.129P2-*Cd38^{tm1Lnd}*/J, “knock out” de CD38.

También se trabajaron las cepas Lyn-/- 129SvImJ, “knock out” de la cinasa Lyn, y Fyn-/- 129SvImJ, “knock out” de la cinasa Fyn que fueron amablemente donadas por la Dra. Claudia González Espinoza (CINVESTAV, Sede Sur, México, D.F.)

B. Iniciadores

Los iniciadores utilizados fueron los siguientes, bajo las sugerencias de Jackson Laboratory para la genotipificación de sus ratones:

Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Tipo
oIMR1325	ATC TTG AGT GCA CCA AGC C	Silvestre
oIMR1326	GGT TGC AGC AGT CTA TGA AGG	Silvestre
oIMR0013	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC	Mutante forward
oIMR0014	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC	Mutante reverse

Tabla 1. Iniciadores para la cepa B6.129S4-*C3^{tm1Crr}*/J.

Iniciadores	Secuencia 5' → 3'	Tipo
oIMR8365	GCA AGT TTC TAT ATG CAT TCT C	Mutante forward
oIMR8366	CCT CCA TTT CCA ATA GGT AG	Mutante reverse
oIMR8367	ATA TGC ATG ATC AAC ACC ACA G	Silvestre forward
oIMR8368	TTT CCA TTG CTG CCC TAT AG	Silvestre reverse

Tabla 2. Iniciadores para la cepa C57BL/10ScNJ.

Iniciadores	Secuencia 5' → 3'	Tipo
oIMR1750	CCG TCT AGC TTG AGC TAT TAG G	Común
oIMR1751	GAA GAG GAC GAT GAA GGT GG	Silvestre
oIMR5255	TTG TGC CCA GTC ATA GCC GAA T	_____

Tabla 3. Iniciadores para la cepa B10.129S2(B6)-*Igh-6^{tm1Cgn}*/J.

C. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales CD43-FITC, CD38-PE, B220-PercP, IgM- APC y CD19 APC-Cy7 usados en la tinción de médula ósea, B220-PB, CD21-FITC, CD24-PE-Cy5, CD23-PE-Cy7, usados en la tinción de bazo de la casa comercial BD Biosciences.

El anticuerpo 2.4 G2, usado para el bloqueo de las fracciones FcR, fue obtenido a partir del sobrenadante de un hibridoma crecido en un biorreactor y purificado a través de columnas de afinidad de sefarosa con proteína G, ambas afines a la región Fc (Reyes, 2010).

D. GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES.

D.1 Extracción de DNA genómico a partir de tejido.

Para poder llevar a cabo la genotipificación de ratones, es necesario llevar a cabo la extracción de DNA a partir de tejido del animal, para lo cual el ratón fue anestesiado con éter etílico, tras lo cual se le cortó no más de 0.2cm de oreja.

El tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga, ya sea de 0.6 ml o 1.5 ml, se le añadió 75µl de agente de lisis alcalina (Anexo I) y se calentó a 95°C, durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de calentamiento, el tubo con la muestra fue enfriado a 4°C y se le añadió 75µl de buffer de neutralización (Anexo I). El DNA se almacenó a -20°C.

D.2 Reactivos para PCR

La DNA polimerasa utilizada fue Deep Vent™ (exo-) DNA Polymerase (New England Biolabs), usando 5 unidades (0.2µl) por reacción de PCR y 1X (2µl) ThermoPol Reaction Buffer: 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100, pH 8.8 a 25°C.

Los deoxirribonucleótidos trifosfato (Promega) fueron usados a una concentración final de 12.5 mM.

Los iniciadores (Invitrogen) fueron usados a concentración final de 10mM. Se añadió de 1.5 a 2µl de DNA. Siendo el volumen final de cada reacción de 20µl.

D.3 Condiciones de PCR

Las condiciones de PCR varían para cada cepa de ratones y son aquellas sugeridas por el laboratorio que distribuye los ratones, The Jackson Laboratory:

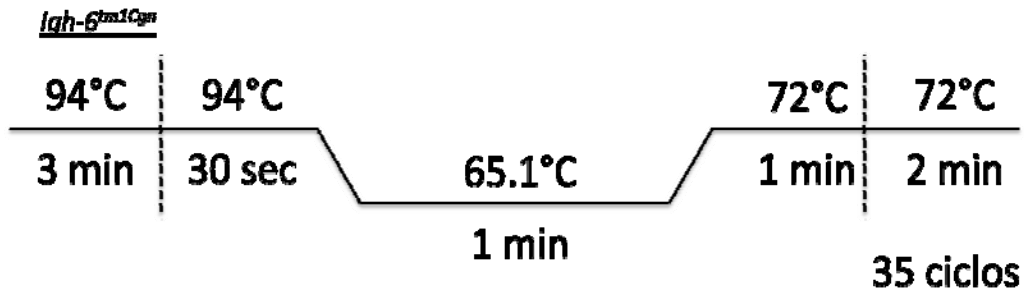


Fig. 12 Un casete de resistencia a neomicina es trastocado en el exón 6 del gen que codifica para los aminoácidos solubles de cadena pesada μ de la inmunoglobulina.

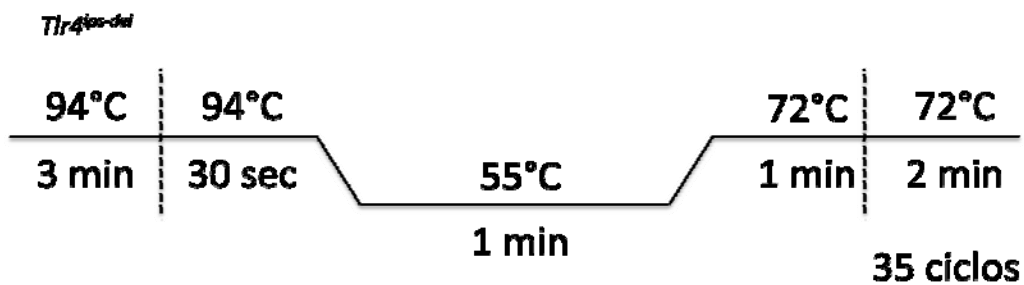


Fig. 13 Este alelo se ha caracterizado por la ausencia de RNAm debido a una delección del locus, el DNA genómico removido compete solo al gen que codifica para el TLR4.

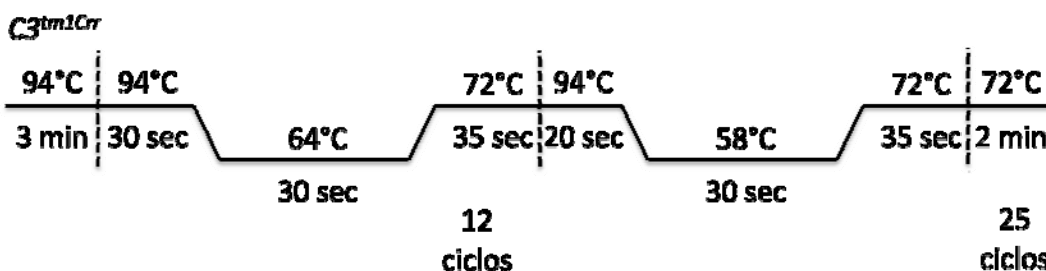


Fig. 14 Una inserción de un casete de resistencia a neomicina en el exón del gen que codifica para C3 remueven las secuencias que codifican para el extremo C-terminal de la cadena β y el extremo N-terminal para la cadena α , incluido el sitio para procesar la molécula pro-C3.

E. FENOTIPIFICACIÓN DE RATONES DEFICIENTES DE CD38

A partir de sangre total se tñieron las células CD38⁺ empleando el anticuerpo monoclonal anti-CD38-PE (BD Biosciences). Para lo cual se sangró al ratón por la cola y se tomo un aproximado de 30 µl de sangre colocándolo en un tubo de microcentrifuga que contenía 30 µl de EDTA 0.5M (Anexo I), posteriormente la sangre fue vertida a un tubo de citometría.

A cada tubo se le agregó 30µl de una dilución 1:200 del anticuerpo anti-CD38-PE y se incubó por 15 min, TA y en oscuridad. Transcurrido este tiempo de incubación, se añadieron 500µl de una dilución 1:10 de la solución de lisis, FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson) y se volvió a incubar, ahora por 10 min, TA y en oscuridad. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 21°C, se decantó y se realizó de uno a dos lavados con PBA (Anexo I); finalmente se resuspendió en 300µl de PBA, en caso de ser adquiridos el mismo día, o bien, fijados en 300 µl de Fix-FACS (Anexo I) y almacenados a 4°C en caso de adquirirlos en días posteriores. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCalibur™ de BD. Adquiriendo un mínimo de 10,000 eventos.

Se evaluó la expresión de CD38 con ayuda del programa WinMDI, versión 2.9

F. TINCIÓN DE BAZO

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, tras lo cual se sumergieron en una solución alcohólica de etanol al 70%, y se hizo un corte en la piel del lado izquierdo, más o menos a la altura de las costillas, se cortó también el músculo y el bazo fue extraído.

El bazo se colocó en una caja Petri con PBS y se trituró con ayuda de una malla y la parte no porosa del émbolo de una jeringa.

Las células fueron recolectadas en tubos cónicos de centrifuga y centrifugadas a 1500 rpm por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lisaron los eritrocitos con la solución de lisis correspondiente (Anexo I), incubándolas con 8 ml de la solución por 10 min.

Transcurrido dicho tiempo de incubación, las células se lavaron de una a dos veces con PBS, pero esta vez, centrifugando a 1500 rpm por 5 min. Las células viables fueron contadas en una cámara de Neubauer previo tratamiento con azul tripan.

Por cada tinción se colocó de tres a seis millones de células. Las células se incubaron por un mínimo de media hora con el anticuerpo 2.4G2, a TA, tras lo cual se realizó un lavado con PBS. Se desechó ese sobrenadante y las células se resuspendieron en el volumen restante (aproximadamente 30µl).

Se colocó 0.3µl de cada anticuerpo y se incubó por un periodo de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Se realizó un lavado con PBS y las células fueron resuspendidas en 300µl ya sea de PBS o de Fix-FACS para su captura en el citómetro de flujo FACSCyan™ adquiriendo un mínimo de 100,000 eventos y su análisis en el programa FlowJo, versión 7.5.5.

G. TINCIÓN DE MÉDULA ÓSEA

Se procedió a extraer tanto fémur como tibia, quitándoles la mayor cantidad posible de tejido adiposo y muscular. Se colocaron ambos huesos en una caja Petri con PBS-SFB 3% frío (Anexo I) y haciendo un

corte en las epífisis (extremo) de los huesos, se hizo pasar la solución de PBS-SFB con ayuda de una jeringa de 1 cc.

Se recolectaron las células en tubos cónicos de centrifuga, haciéndolas pasar primero por tela de organza, esto es para eliminar restos de hueso o de tejido que pudieran complicar su posterior adquisición al citómetro. Se centrifugaron a 1500 rpm, por 10 min, a 4°C. Se desechó ese sobrenadante y se lisaron los eritrocitos con la solución de lisis correspondiente (Anexo I), incubando por 5 min con 5 ml de la solución de lisis. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron una sola vez con PBS-SFB3%, centrifugando a la misma velocidad y temperatura solo que ahora por 5 min.

Por cada tinción se colocó de tres a seis millones de células. Las células se incubaron por un mínimo de media hora con el anticuerpo 2.4G2, en hielo, tras lo cual se realizó un lavado con PBS-SFB3%. Se desechó ese sobrenadante y las células se resuspendieron en 50µl de PBS-SFB3%.

Se colocó 1µl de cada anticuerpo y se incubó por un lapso de 15 a 20 min, en hielo y en oscuridad, tras lo cual las células fueron lavadas con PBS-SFB3% y resuspendidas en 300µl de PBS-SFB3% para su inmediata adquisición en citómetro de flujo FACSCyan™, adquiriéndose 1,000,000 de eventos, y su análisis en el programa FlowJo, versión 7.5.5.

H. IDENTIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE MADURACIÓN DE LINFOCITOS B.

Como muchos otros laboratorios, nuestra clasificación se basa en la estrategia inicial propuesta por Hardy y colaboradores (1991), donde las células pre-pro B son caracterizadas como CD45R^{pos} CD43^{pos} CD24^{neg} y las células pro-B como CD45R^{pos} CD43^{pos} CD24^{pos}, pero, dado que la población CD45R^{pos} CD43^{pos} es heterogénea, una clasificación alterna es la propuesta por Tudor y colaboradores(2000), donde dichas subpoblaciones se distinguen por la expresión de CD19, siendo las células pro-B positiva para tal marcador. En etapas posteriores, el marcador CD43 se pierde, dentro de esta subpoblación se encuentran las células pre-B, que, aunque a pesar de expresar la cadena pesada Igµ en su citoplasma, no lo hacen en la superficie celular, y las células B inmaduras que expresan IgM de membrana. (Hardy y Hayakawa, 2001)

En cuanto a los estadios de maduración en bazo, se sigue la clasificación de Loder y colaboradores (1999): T1 (CD24^{high}, CD21^{low}), T2 (CD24^{high}, CD21^{high}), M (CD24^{low}, CD21^{intermediate}), a su vez, la región T2 se subdivide en células realmente T2 CD23⁺ y de zona marginal CD23⁻. (Loder,1999).

I. ESTADÍSTICA

Se hizo una prueba T de student pareada a dos colas y un intervalo de confianza de 95% para comparar los resultados obtenidos de forma individual entre la cepa “knockout” con su respectiva cepa control.

Debido a la disponibilidad de los ratones el número de experimentos individuales (n) varió para cada cepa de ratones:

Cepa	n Médula ósea	n Bazo
KO TLR4	4	7
KO CD38	3	4
KO C3	3	4
KO LYN	6	6
KO FYN	-	3
KO sIgM= KO IgH	5	-

Cada experimento se corrió a la par con un ratón control.

Dado que cada cepa puede reflejar un porcentaje distinto de estadios de maduración, la estadística se realizó también en base al número total de células.

RESULTADOS

1. Genotipificación o fenotipificación de las distintas cepas de ratones.

Se llevó a cabo la genotipificación de las cepas: B6.129S4- $C3^{tm1Crr}/J$, C57BL/10ScNJ y B10.129S2(B6)- $Igh-6^{tm1Cgn}/J$ con los iniciadores y condiciones de PCR de Jackson Laboratory, comprobándose el resultado mediante un gel de agarosa al 2% (figuras 11,12,13).

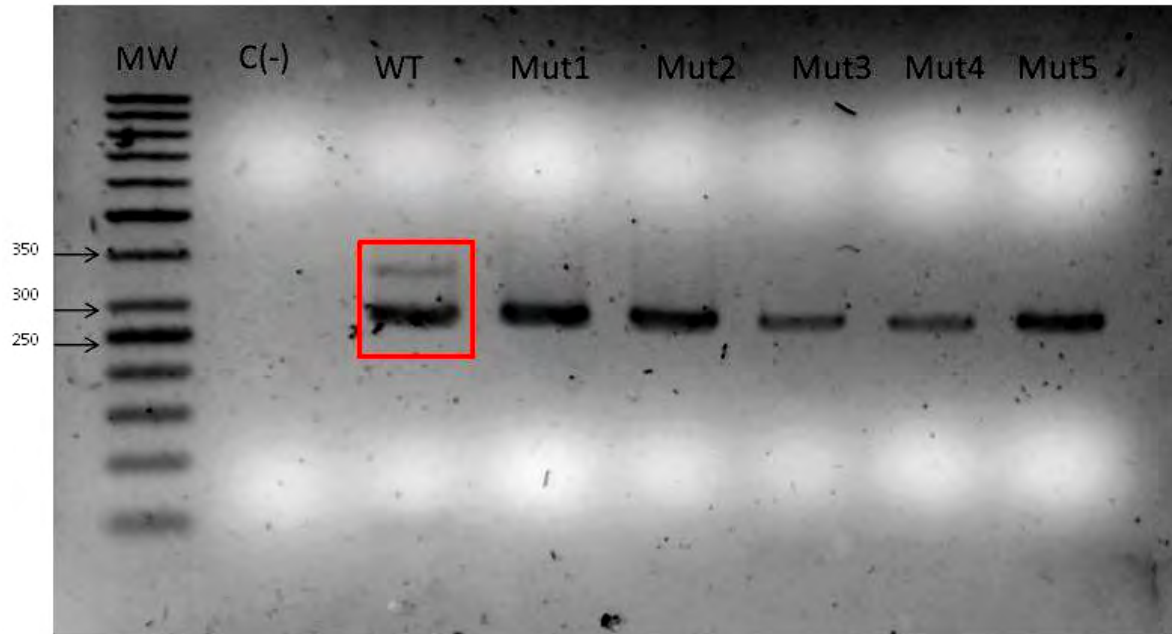


Fig. 15 Genotipificación de la cepa B6.129S4- $C3^{tm1Crr}/J$, "knock out" de C3. Bandas esperadas, WT: 350pb, Mut:280 pb, Heterocigoto: ambas bandas

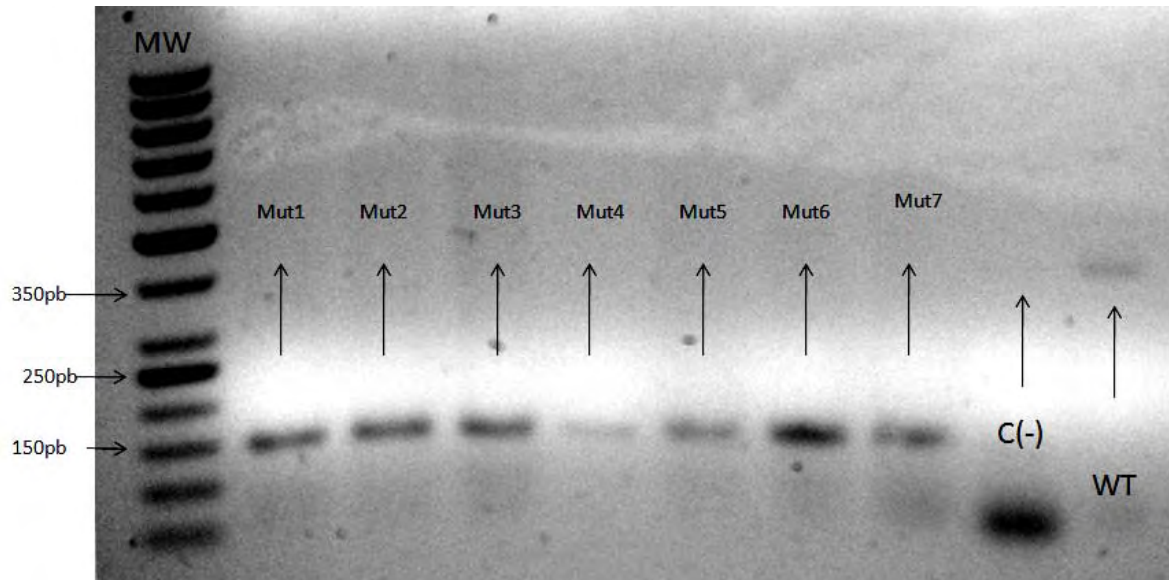


Fig. 16 Genotipificación de la cepa C57BL/10ScNJ, “knock out” de TLR4. Bandas esperadas, WT: 390pb, Mut: 140 pb, Htz: ambas bandas

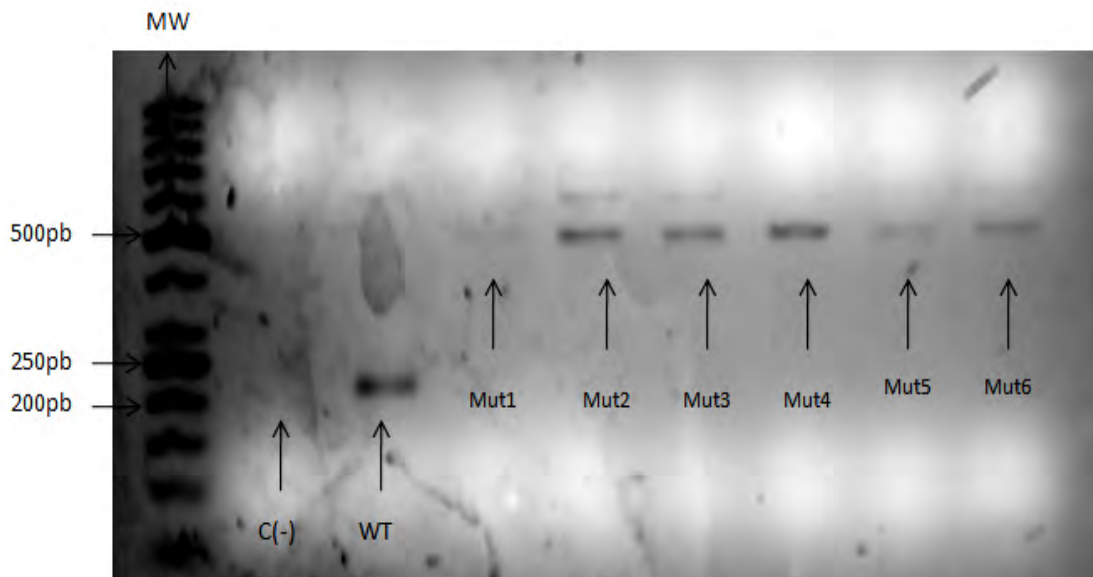


Fig. 17 Genotipificación de la cepa B10.129S2(B6)-*Igh-6^{tm1Cgn}*/J, “knock out” de sIgM . Bandas esperadas, WT: 210pb, Mut: 500 pb, Htz: ambas bandas

Por otro lado, la fenotipificación de los ratones “knock out” de CD38 se realizó mediante una tinción de citometría de flujo de sangre periférica utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD38 marcado con ficoeritrina.

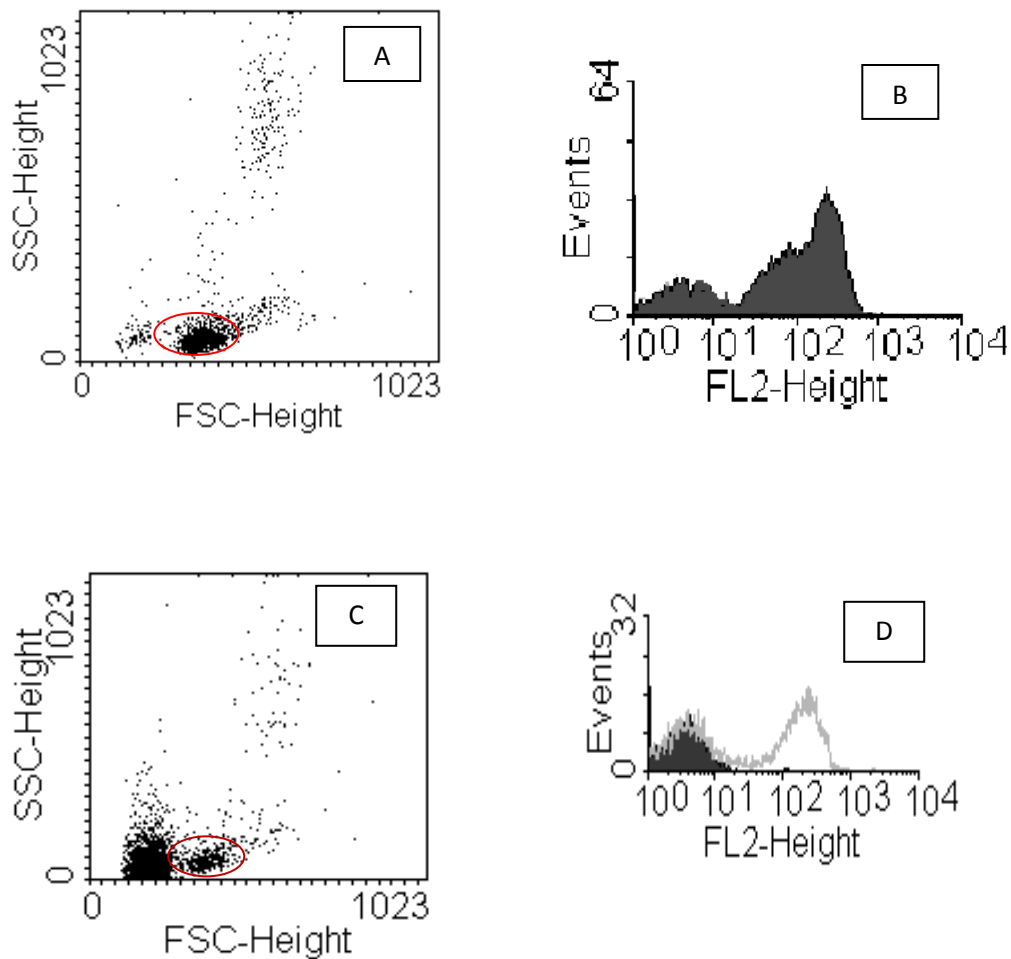


Figura. 18 Fenotipificación de ratones “knock out” de CD38. En A) gráfica de tamaño contra granularidad en la tinción sangre periférica de un ratón C57BL6J, en un círculo rojo se enmarca la región de linfocitos, en B) histograma de la fluorescencia de CD38 del mismo ratón, en la región de linfocitos; en C) gráfica de tamaño contra granularidad en la tinción de sangre periférica de un ratón “knock out” de CD38 en fondo C57BL6J, en un círculo rojo, la región de linfocitos; en D) histograma de la fluorescencia de CD38 del ratón deficiente, el histograma vacío indica aquel obtenido por el ratón control.

En el histograma para el ratón control existen dos tipos de poblaciones: una que no expresa CD38 y otra que si lo hace, que se ubica a la derecha del histograma; a diferencia del histograma para el ratón “knock out” de CD38, donde no podemos observar la población que expresa la molécula.

2. Identificación de los distintos estadios de maduración del linfocito B

2.1 Identificación de los distintos estadios de maduración del linfocito B en médula ósea

Como se mencionó en materiales y métodos, se pueden identificar los distintos estadios del linfocito B a través de marcadores en su superficie y mediante citometría de flujo. Se utilizó la

clasificación de Hardy y Hayakawa (2001) para definir los distintos estadios de maduración del linfocito B en médula ósea.

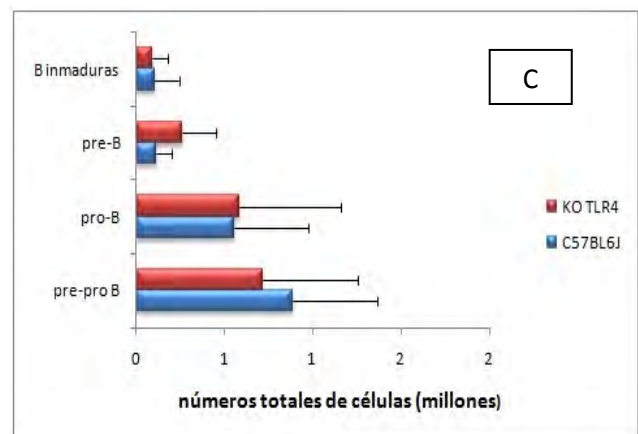
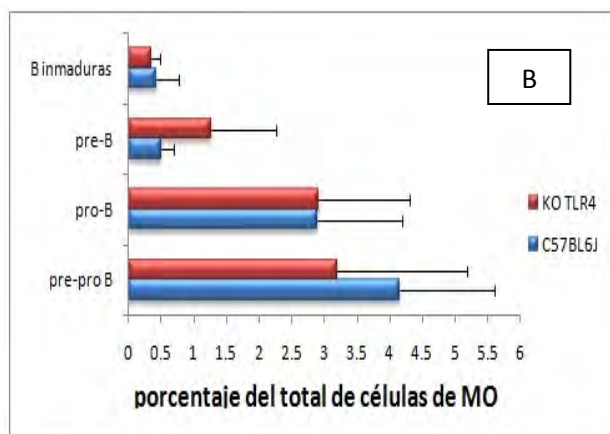
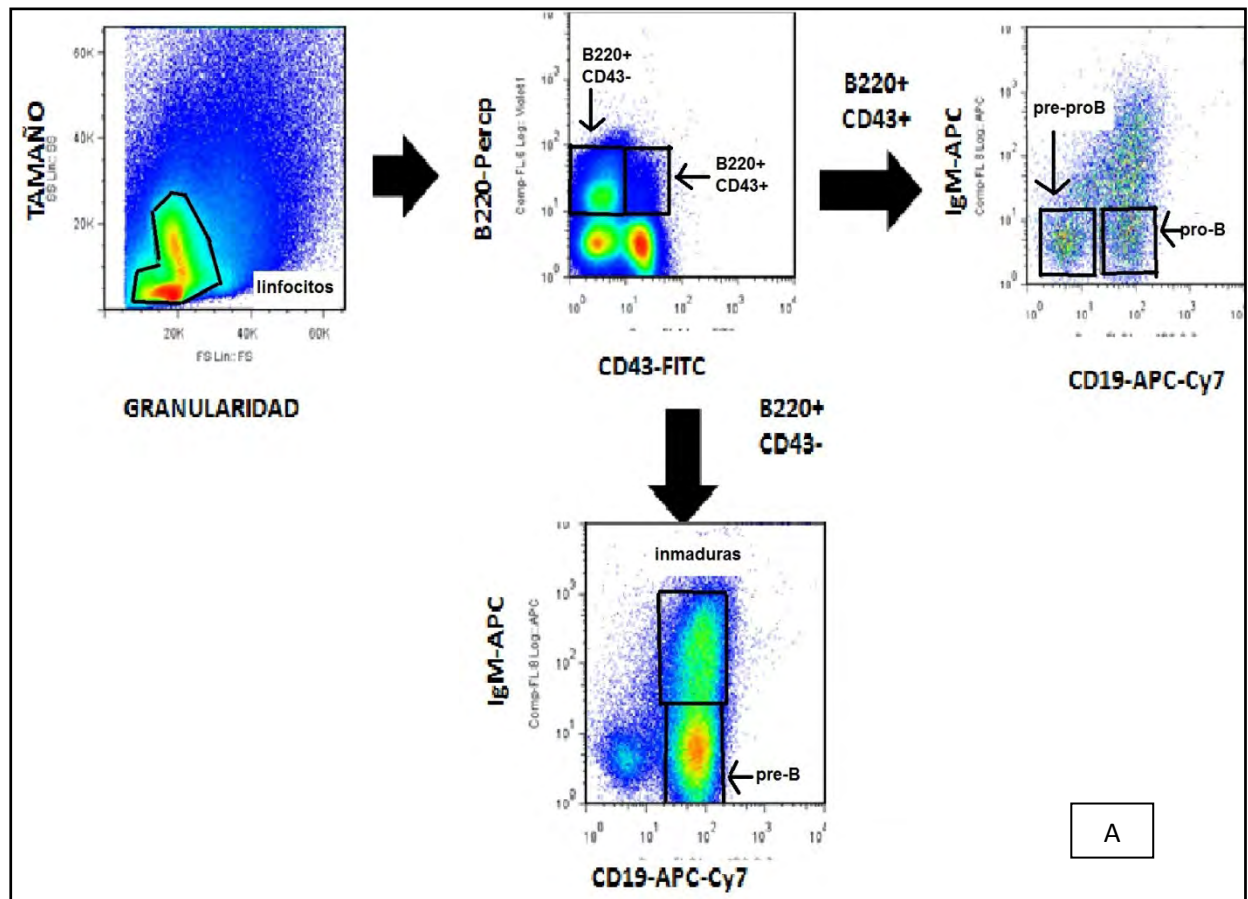


Figura. 19 La expresión de TLR4 en LcB no es necesaria para el desarrollo del mismo a nivel de médula ósea. En A) Selección de la región de linfocitos y análisis de los distintos estadios de maduración, en B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células de la cepa deficiente de TLR4. n=4

Es bien conocido el papel de los receptores tipo Toll en linfocitos B maduros en la respuesta frente a antígenos T-independientes, en lo que se refiere a la proliferación y diferenciación hacia células secretoras de anticuerpos, pero poco se conoce del papel de dichos receptores durante las etapas más tempranas del desarrollo del linfocito B. Ahora sabemos por la literatura que en dichos estadios, los linfocitos B expresan TLR4, son capaces de responder a LPS, de diferenciarse a células IgM⁺ y de llevar a cabo cambio de isotipo independientemente de la expresión de un BCR (Hayashi,2005; Melamed,2008). Sin embargo, como se muestra en la figura 19, nuestros resultados sugieren que a pesar de tener la capacidad de ser activados vía TLR4, dicho receptor no es esencial en la maduración del linfocito B, pues no se observan diferencias significativas respecto la cepa control.

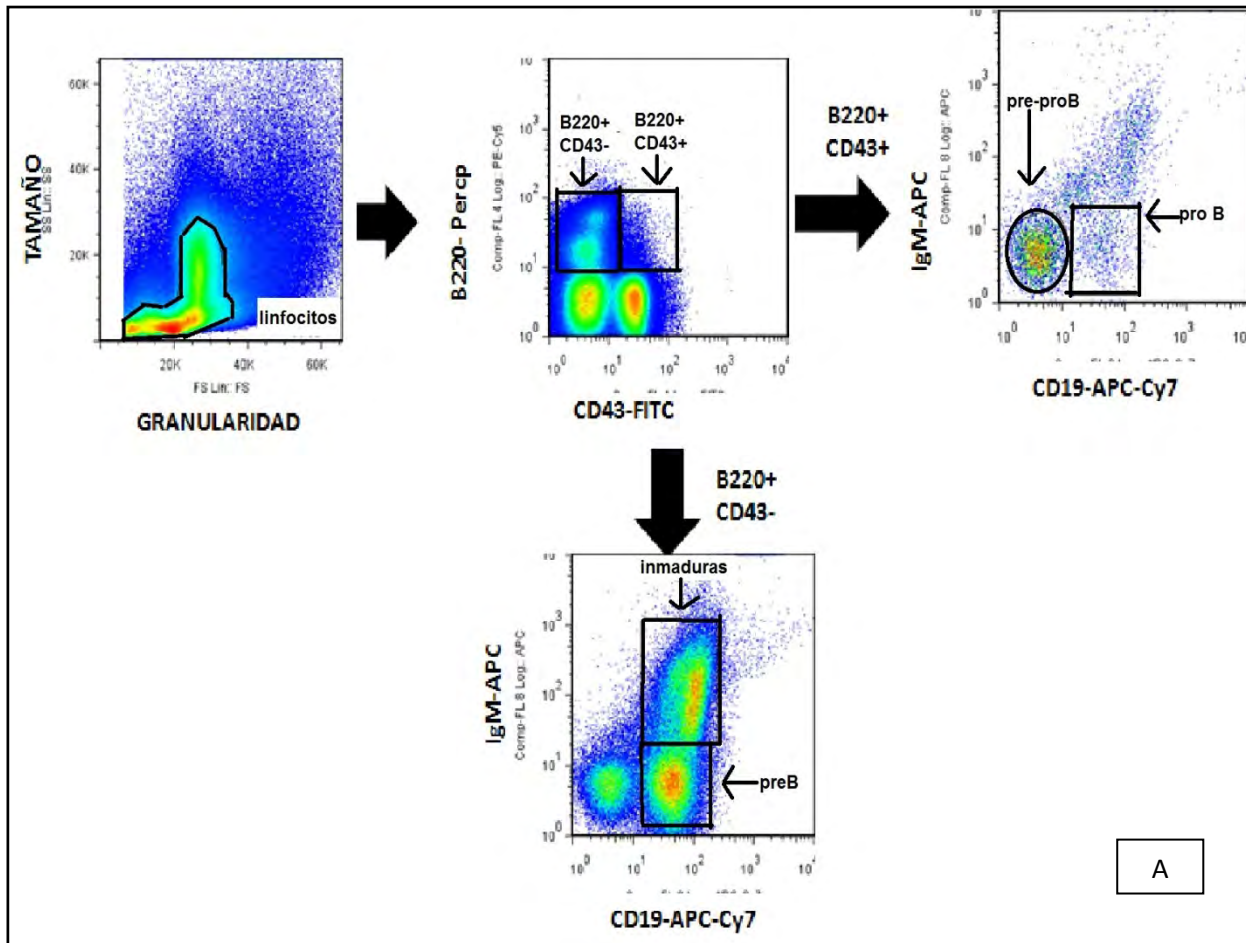


Figura 20. El producto principal del sistema del complemento, C3, no participa en el desarrollo del LcB, a nivel de médula ósea. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración.

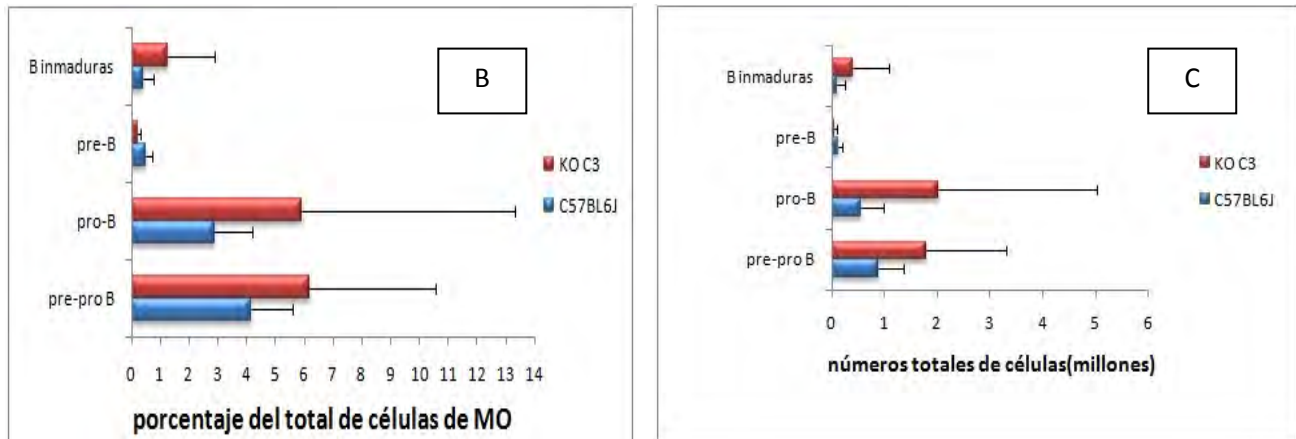
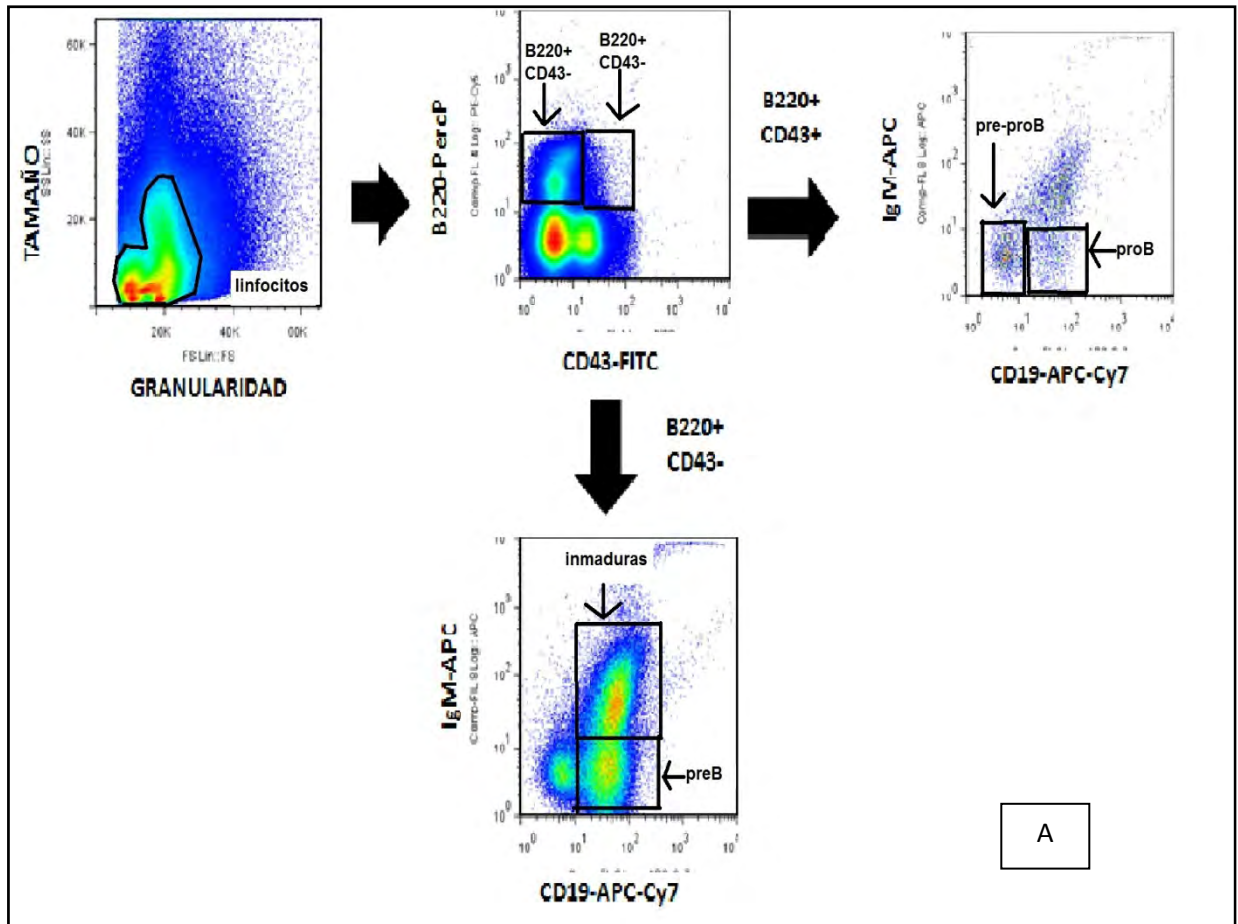
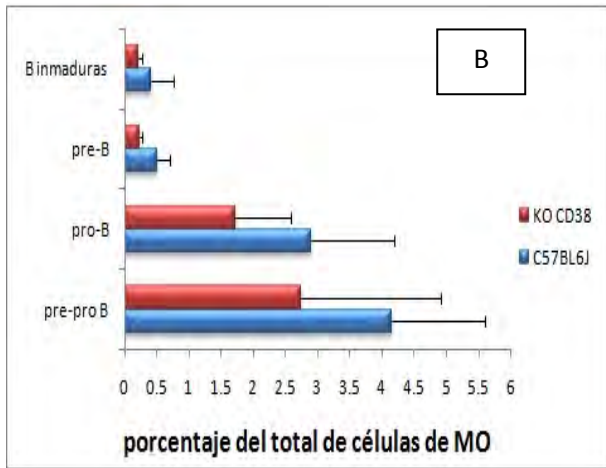


Figura 20bis. El producto principal del sistema del complemento, C3, no participa en el desarrollo del LcB, a nivel de médula ósea B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células* $p < 0.05$ respecto a la cepa control. $n = 3$

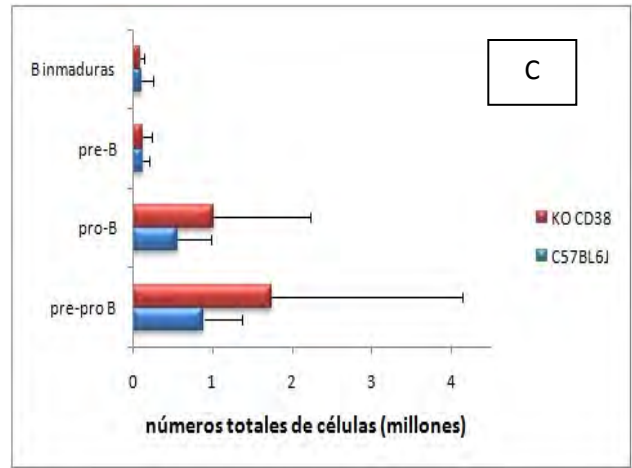
Como se observa en la figura 20 bis, se observó un número reducido de porcentaje de células pro-B en el ratón “knock out” de C3 en comparación con la cepa control C57BL6J, dado que no hay diferencia significativa respecto al número total de células pro-B, sería necesario aumentar el tamaño de la muestra ($n=3$) para asegurar que dicha diferencia es o no significativa. Por otro lado los resultados están en concordancia con lo reportado en la literatura, el ratón “knock out” de C3 tiene el mismo fenotipo que la cepa silvestre, es decir los porcentajes y los números totales de cada estadio no se modifica, solo presenta defectos en la formación de centros germinales y una respuesta humoral débil. (Fischer,1996).



A



B



C

Figura. 21 La expresión de CD38 es prescindible en las primeras etapas de maduración del LcB en médula ósea. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración, en B) porcentaje del total de linfocitos, en C) números totales de células. n=3

Como se observa en la figura 21, tanto en porcentajes como en números totales, no existen diferencias significativas entre el ratón “knock out” de CD38 y el ratón silvestre, sugiriendo que CD38 no es esencial para el desarrollo del linfocito B, en estas primeras etapas. #

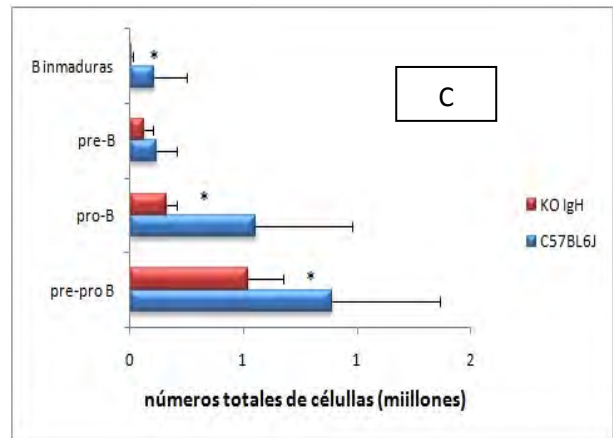
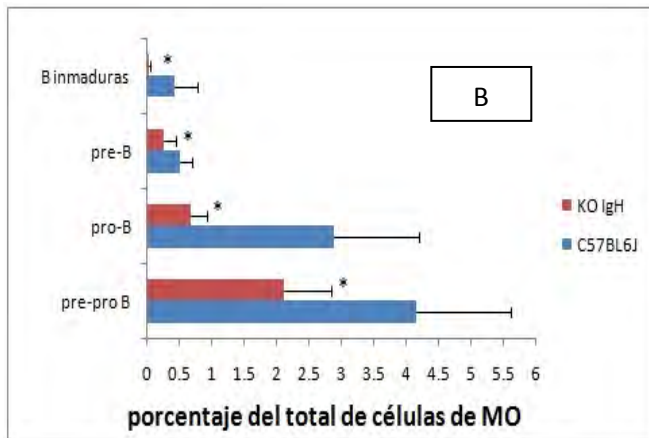
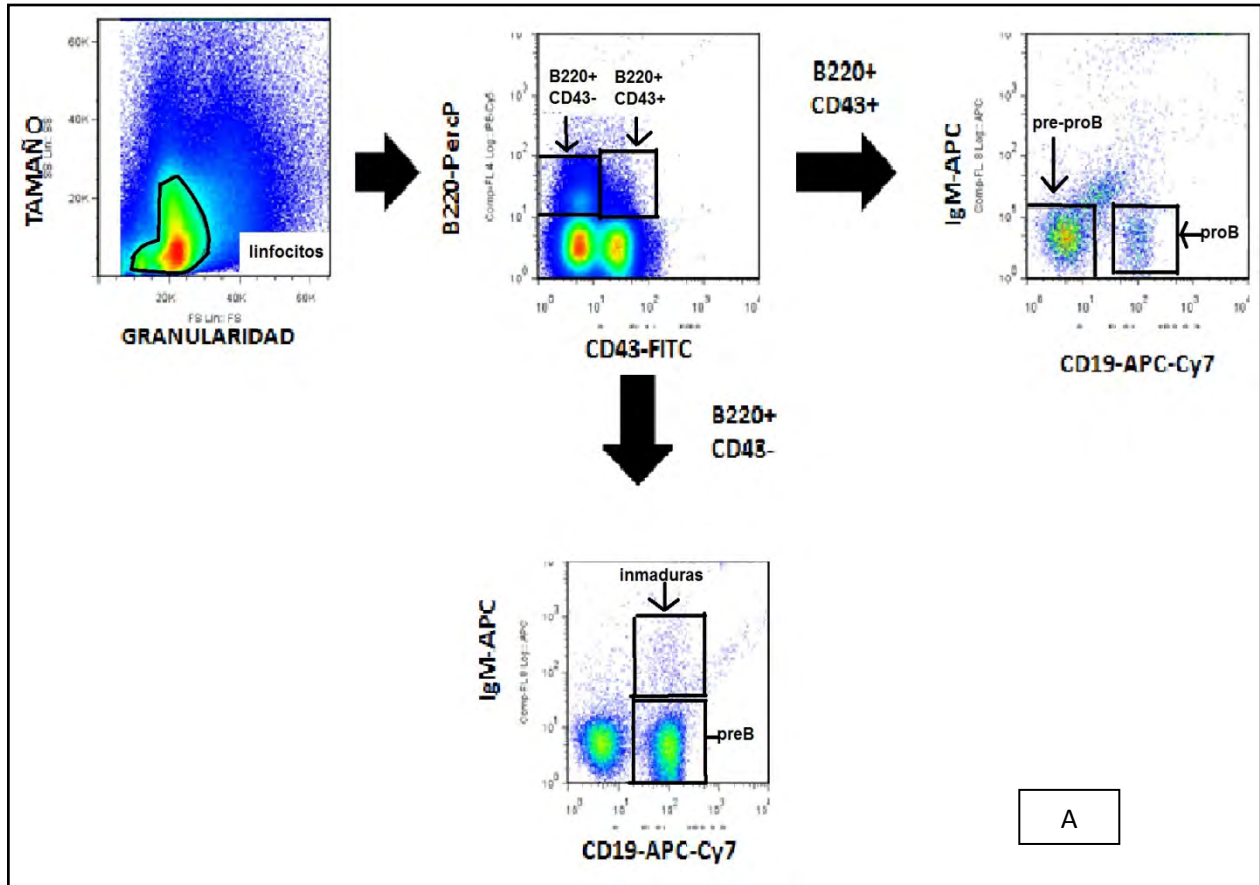


Figura.22 La forma soluble de IgM participa en las primeras etapas de maduración del LcB, siendo de vital importancia en el estado de B inmaduras. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración, en B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células de la cepa deficiente de sIgM . * p<0.05 respecto a la cepa control. n=5

El ratón transgénico de la figura 22, tiene linfocitos B que no secretan IgM pero que la expresan unida a su membrana, lo que permite aplicar la clasificación de Hardy y Hayakawa (2001) y distinguir un número determinado de células B inmaduras. Boes (1998) observó también un número significativamente mayor de linfocitos pre- y pro- B, como una sola fracción, pero contrario a nuestros resultados, observó también un número significativamente mayor de linfocitos B inmaduros. Es importante mencionar que la clasificación usada por el autor difiere de la propia, ya que clasifica a las células B220^{ow} IgM⁻ como pro- B y pre- B y a los linfocitos B inmaduros los clasifica como B220⁺ IgM⁺. Aunque Boes y colaboradores aseguran que no se afecta la maduración del linfocito B en médula ósea, en estos ratones, nuestros resultados sugieren lo contrario.

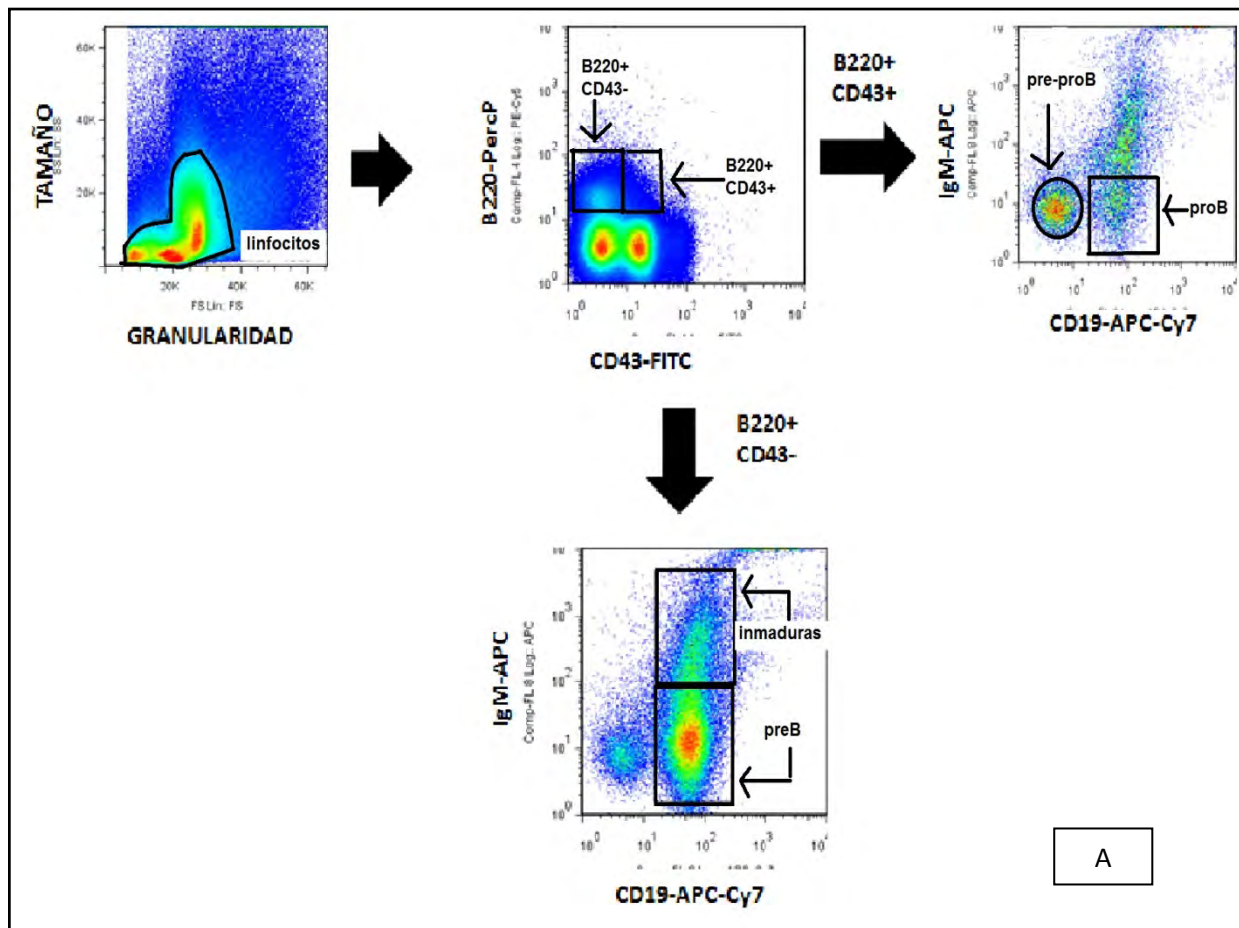


Figura. 23 La expresión de la cinasa Lyn, involucrada en procesos de señalización es prescindible en las primeras etapas de maduración. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración

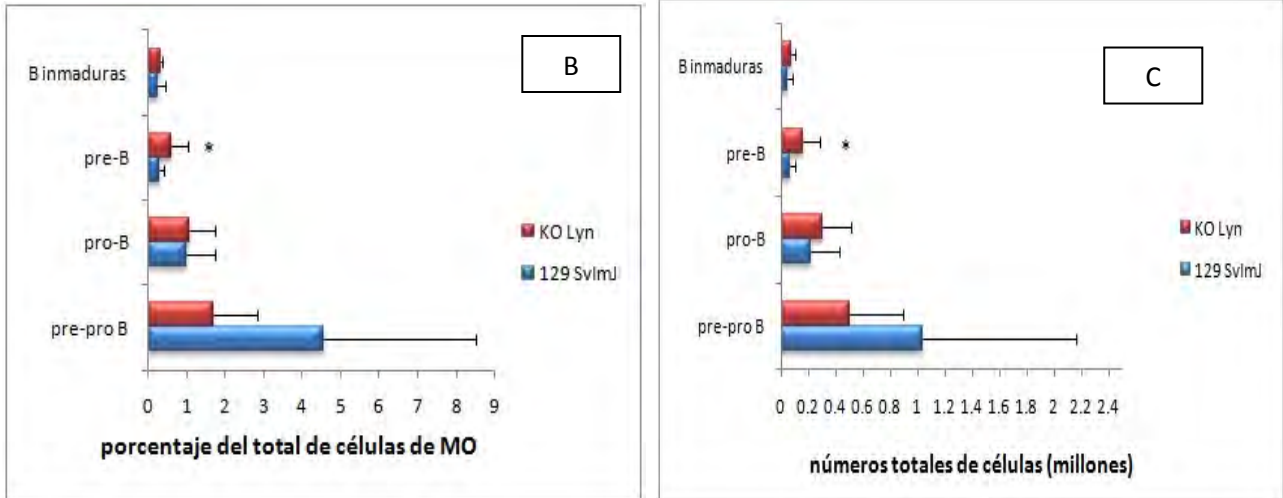
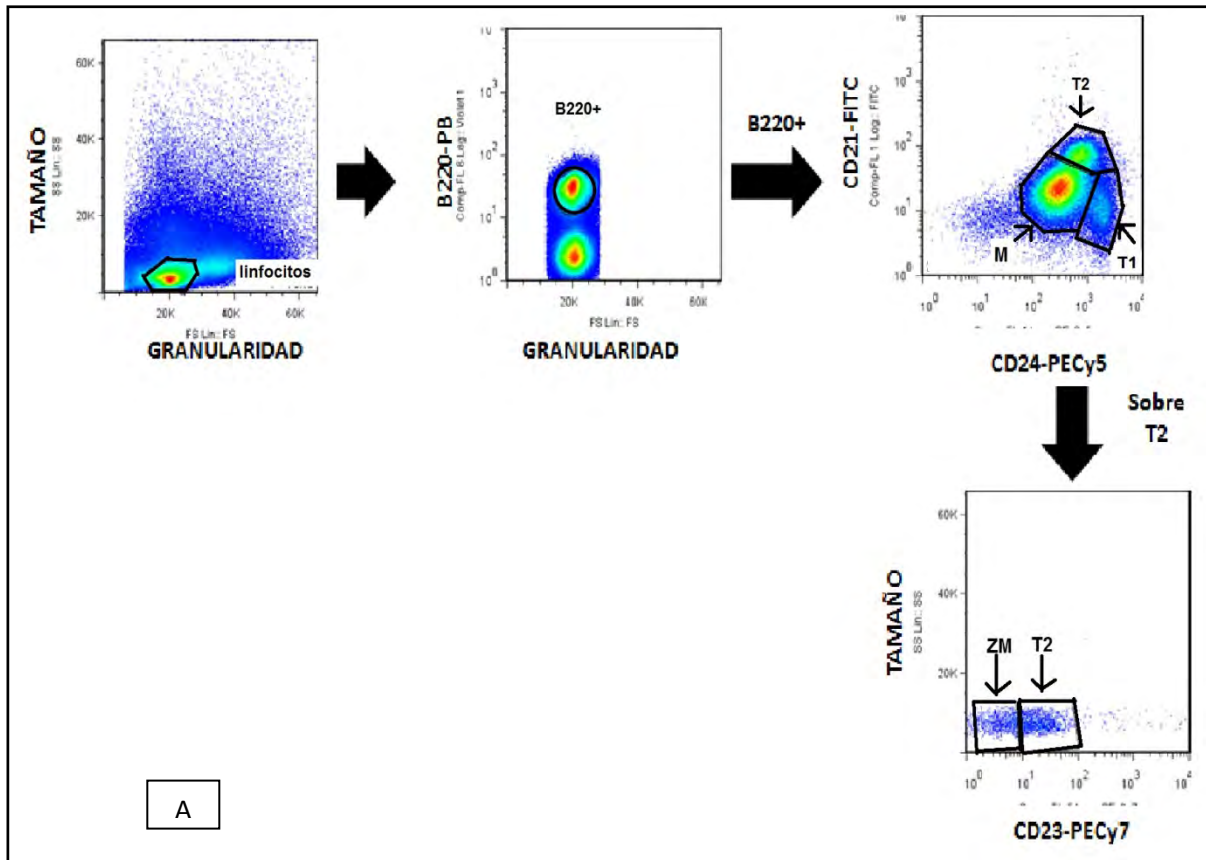


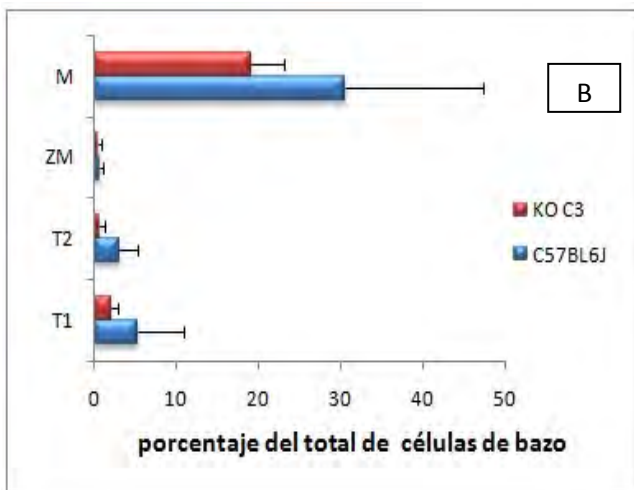
Figura. 23 bis La expresión de la cinasa Lyn, involucrada en procesos de señalización es prescindible en las primeras etapas de maduración. En B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células de la cepa deficiente de la cinasa Lyn.* $p < 0.05$ respecto a la cepa control. $n = 6$

2.2 Identificación de los distintos estadios de maduración del linfocito B en bazo

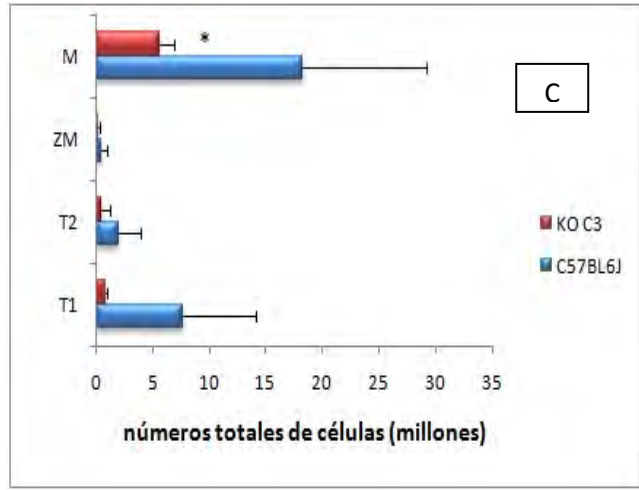
Así mismo, se usan distintos marcadores de superficie para clasificar cada estadio de maduración del linfocito B en el bazo. (AnexoII)



A



B



C

Figura. 24 El producto del complemento, C3, podría estar participando en los procesos de maduración del linfocito B que ocurren en el bazo. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración, en B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células para la cepa deficiente de C3. * $p < 0.05$ respecto a la cepa control. $n = 4$

Cuando Hasewaga y colaboradores (2001) analizaron el número total de linfocitos B de bazo en ratones “knock out” de C3 no encontraron diferencias significativas, sin embargo no llevaron a cabo el análisis detallado de cada estadio de maduración. Los resultados obtenidos en la figura 24, sugieren la participación del complemento en las etapas de maduración en el bazo pues se observa una reducción significativa de células maduras.#

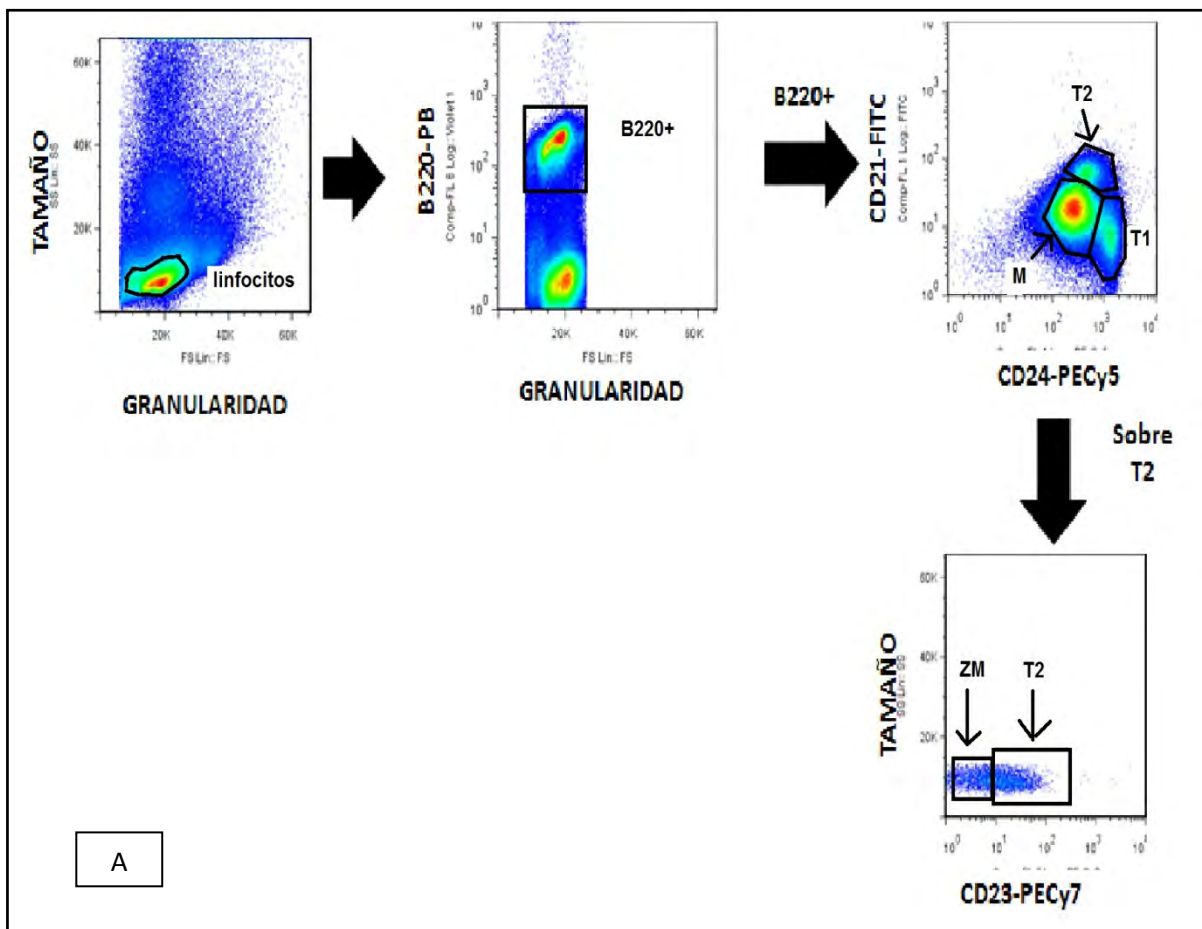


Figura. 25 La ausencia de TLR4 sobre el LcB repercute en el proceso de maduración del LcB, encontrando una disminución de linfocitos B T1 y linfocitos B maduros. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los

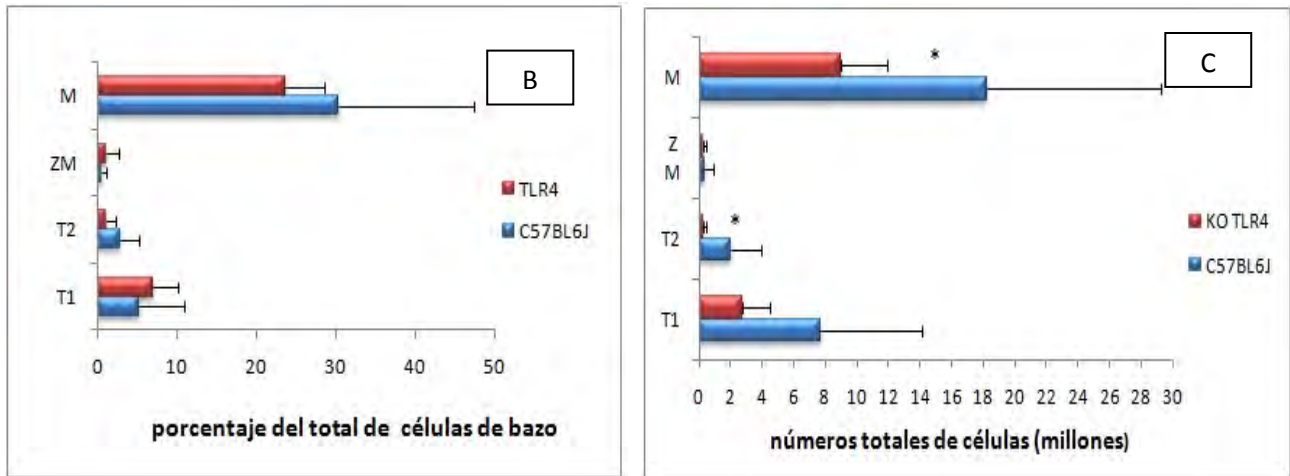
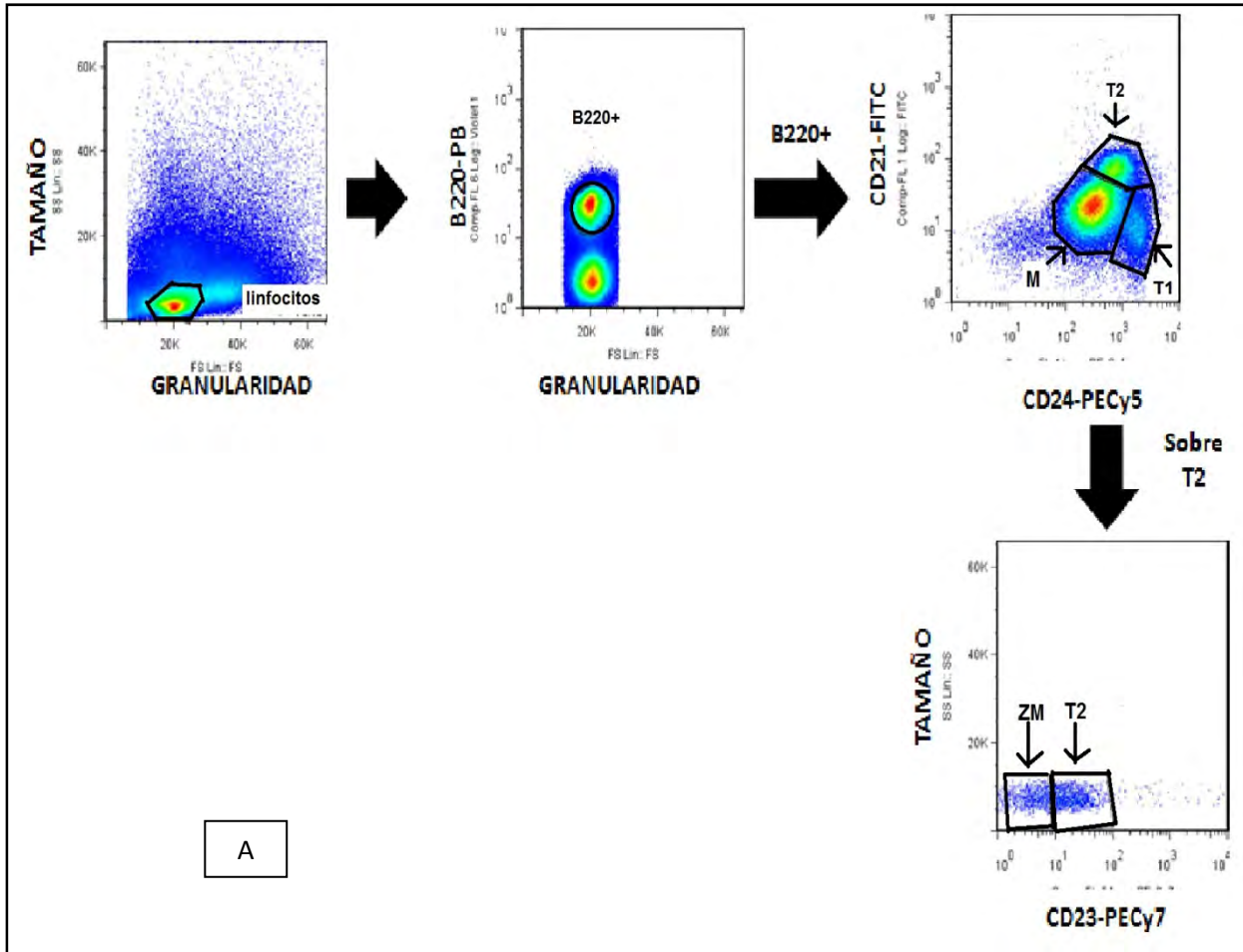
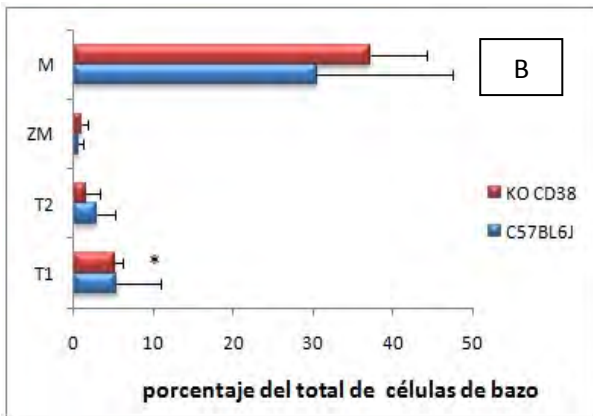


Figura. 25 bis La ausencia de TLR4 sobre el LcB repercute en el proceso de maduración del LcB, encontrando una disminución de linfocitos B T1 y linfocitos B maduros B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células de la cepa deficiente de TLR4 en bazo. * $p < 0.05$ respecto a la cepa control. $n = 7$

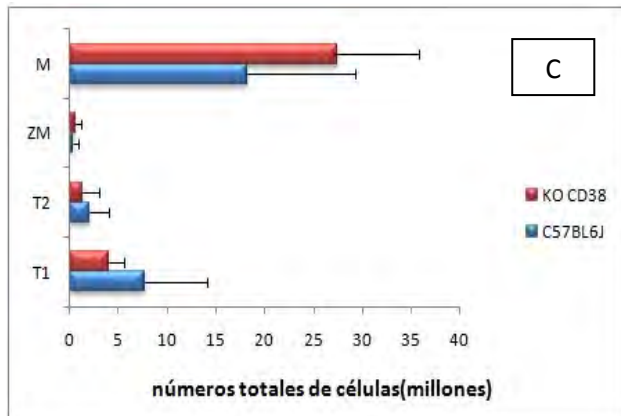
En la literatura podemos encontrar gran número de ensayos donde se prueba que la señalización a través de TLR's está involucrada en la activación y diferenciación del linfocito B hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpo y hacia células B de memoria (Rawlings, 2007), sin embargo poco se sabe de su participación en el proceso de maduración. Los resultados de la figura 25 bis muestran un número significativamente menor de células B T1 y células B maduras en el ratón "knock out", sugiriendo la posible participación de TLR4 en el proceso de maduración.



A



B



C

Figura. 26 En ausencia de CD38 hay una disminución aparente de células en el estadio de transicionales uno y dos. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración en B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células. * $p < 0.05$ respecto a la cepa control. $n = 4$

Como se observa en la figura 26, hay una disminución aparente de células en el estado de transicionales uno y dos, sin embargo la diferencia no es significativa, por lo que se recomienda aumentar la n de estudio.

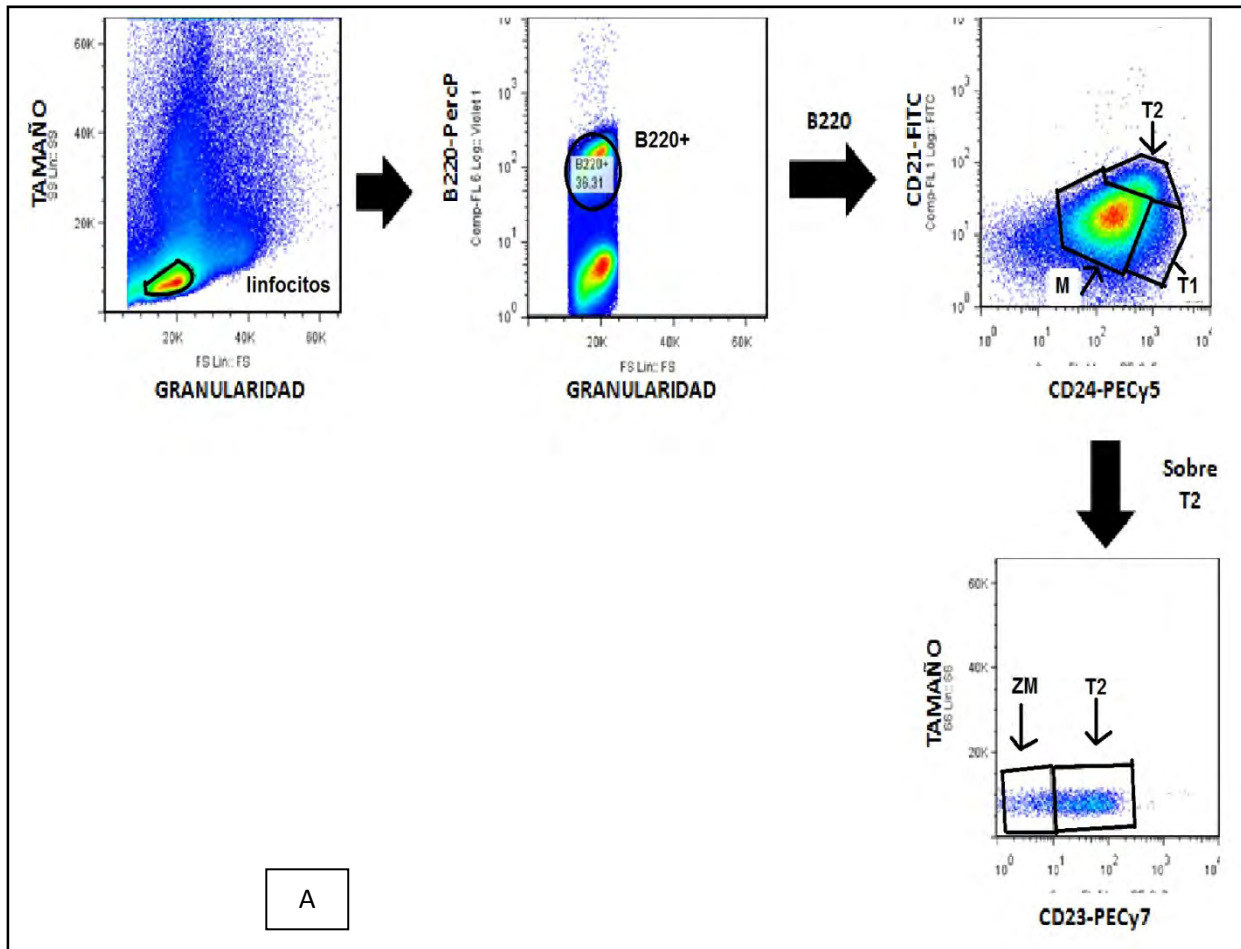


Figura. 27 La cinasa Lyn juega un rol importante en las etapas de maduración que ocurren en el bazo. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración

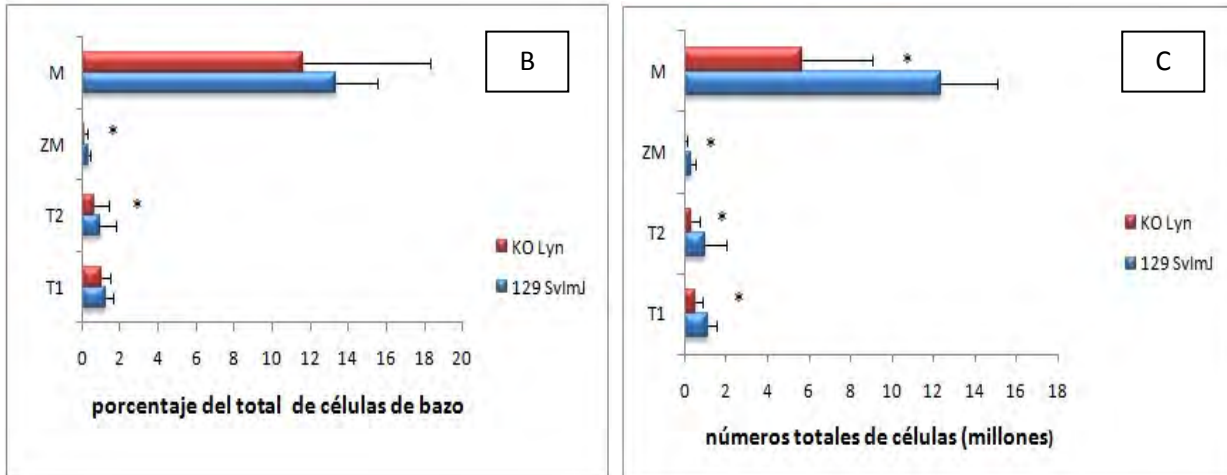
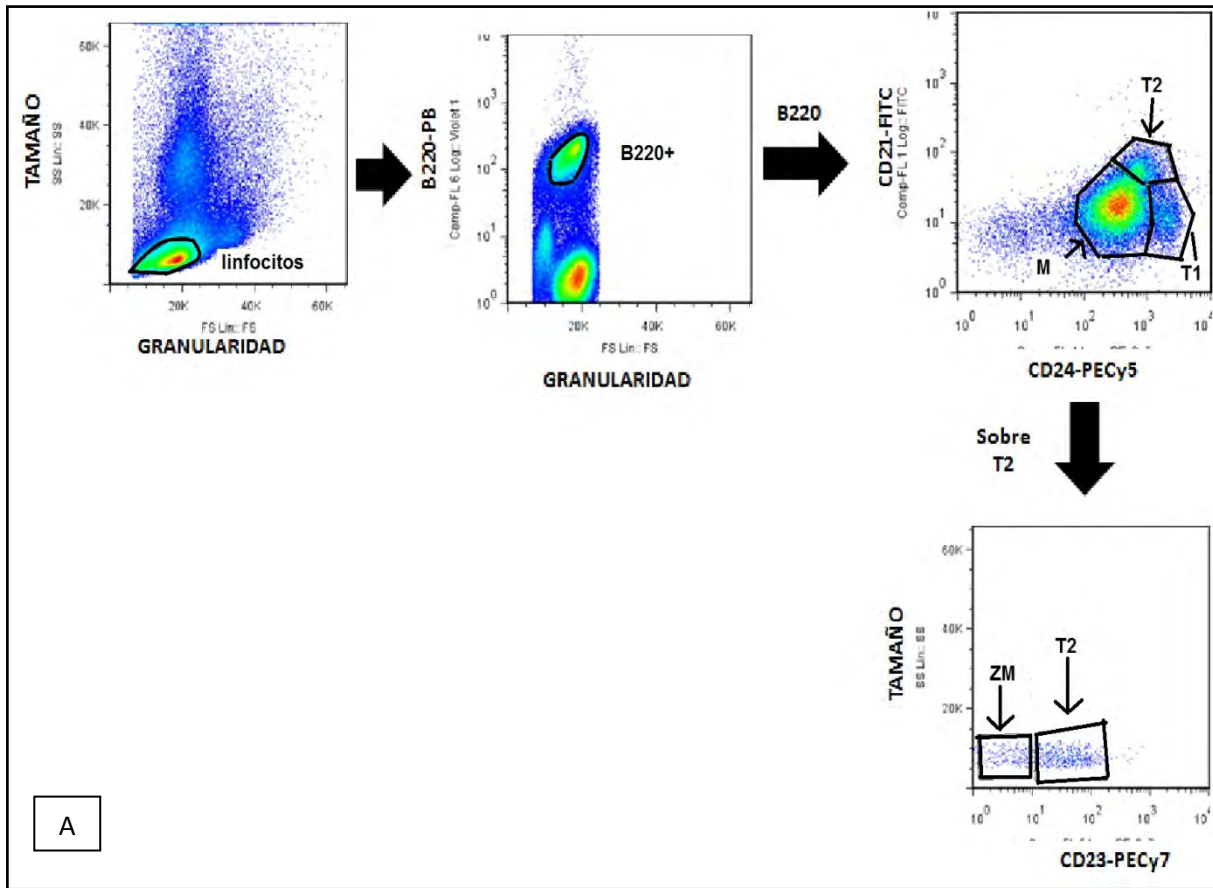
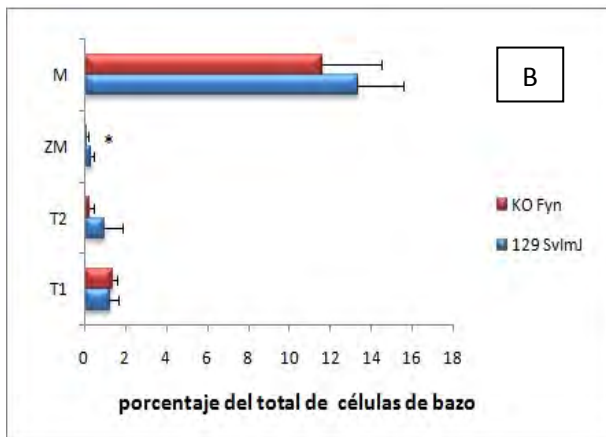


Figura. 27bis La cinasa Lyn juega un rol importante en las etapas de maduración que ocurren en el bazo. En B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células de la cepa deficiente de la cinasa Lyn.* $p < 0.05$ respecto a la cepa control. $n=6$

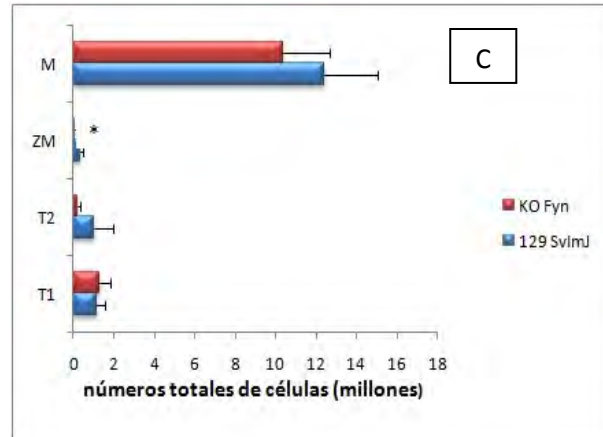
Ferry y colaboradores (2005) encontraron que tanto el ratón “knock out” de CD22 como de la cinasa Lyn, tienen un número significativamente reducido de linfocitos B de zona marginal, se piensa que dicha reducción es un reflejo de las alteraciones en la señalización del BCR. Las células de bazo, del ratón “knock out” de Lyn, frente al estímulo con un antígeno se diferencian rápidamente hacia células plasmáticas. (Ferry,2005)



A



B



C

Figura. 28 En el ratón “knock out” de la cinasa Fyn se observa un número reducido de LcB de zona marginal. En A) selección de la población de linfocitos y análisis de los estadios de maduración, en B) porcentaje del total de linfocitos y en C) números totales de células para la cepa 129 SvImJ Fyn^{-/-}. * p<0.05 respecto a la cepa control. n=3

Mucho se ha publicado de la cinasa Fyn y su papel en el desarrollo de autoinmunidad, así como la incapacidad de los linfocitos B “knock out” de Fyn para proliferar frente un estímulo con CD38. (Yu,2003; Rodriguez-Alba, 2008), pero poco se sabía del número de células en cada estadio de maduración: al igual que en el ratón “knock out” de la cinasa Lyn observamos un número significativamente reducido de linfocitos B de zona marginal, esto era de esperarse pues ambas cinasas juegan un rol muy importante en la transducción de señales a través del BCR.

3. Expresión de CD38 durante la ontogenia del linfocito B en las distintas cepas de ratones.

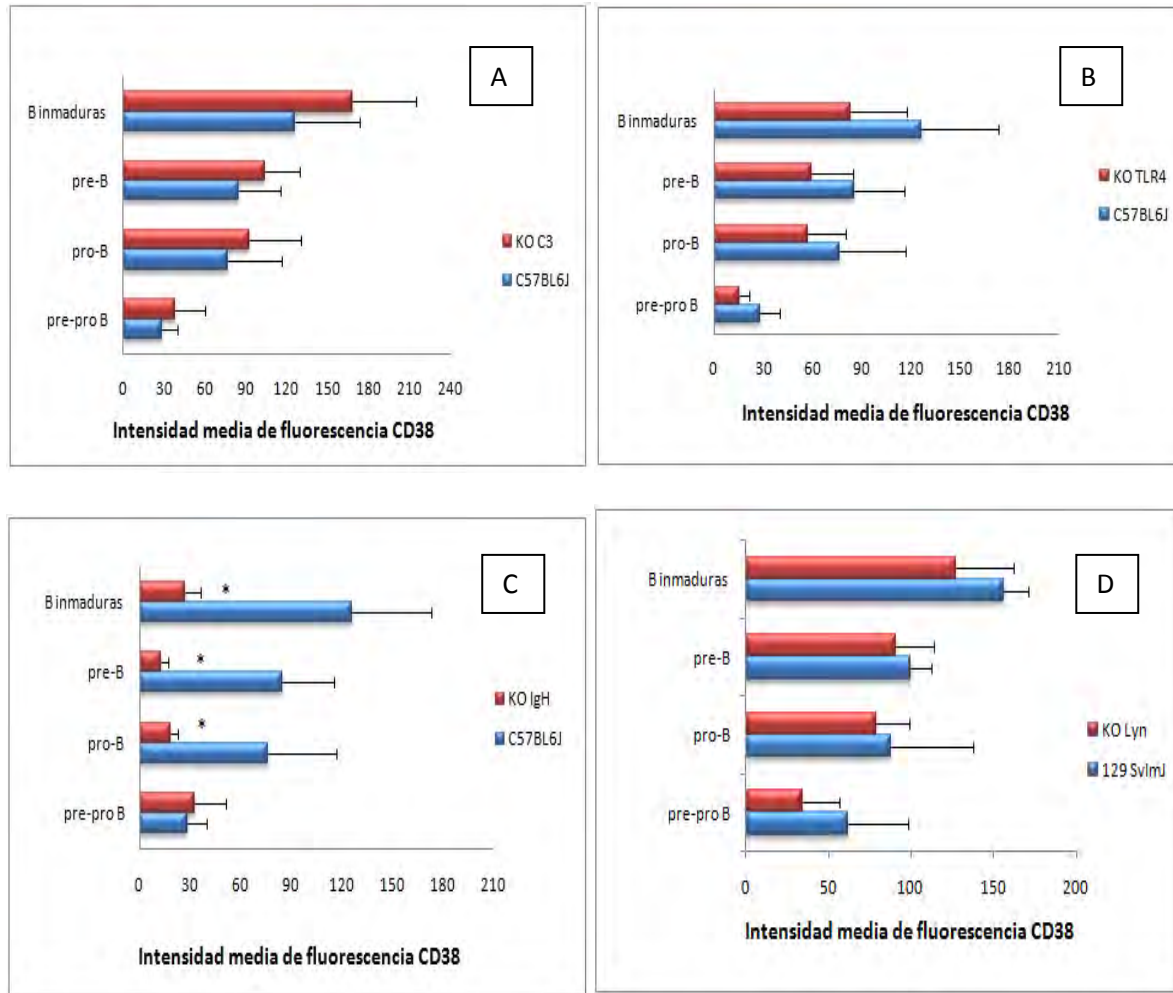


Figura. 29 En ausencia de la forma soluble de IgM la intensidad media de fluorescencia de CD38 se ve disminuida de manera significativa en médula ósea. En A) expresión de CD38 en la cepa “knock out” de C3, en B) expresión de CD38 para la cepa “knock out” de TLR4, en C) expresión de CD38 en la cepa “knock out” de IgH; en D) expresión de CD38 en la cepa “knock out” de Lyn.

* $p < 0.05$ respecto a la cepa control

Se observa que la intensidad media de fluorescencia de CD38 aumenta conforme el linfocito B madura en la médula ósea a excepción del ratón “knock out” de IgM, donde la intensidad media de fluorescencia

decae de manera significativa desde el estadio de pro-B. En lo que respecta al resto de las cepas, no se observa una diferencia significativa.

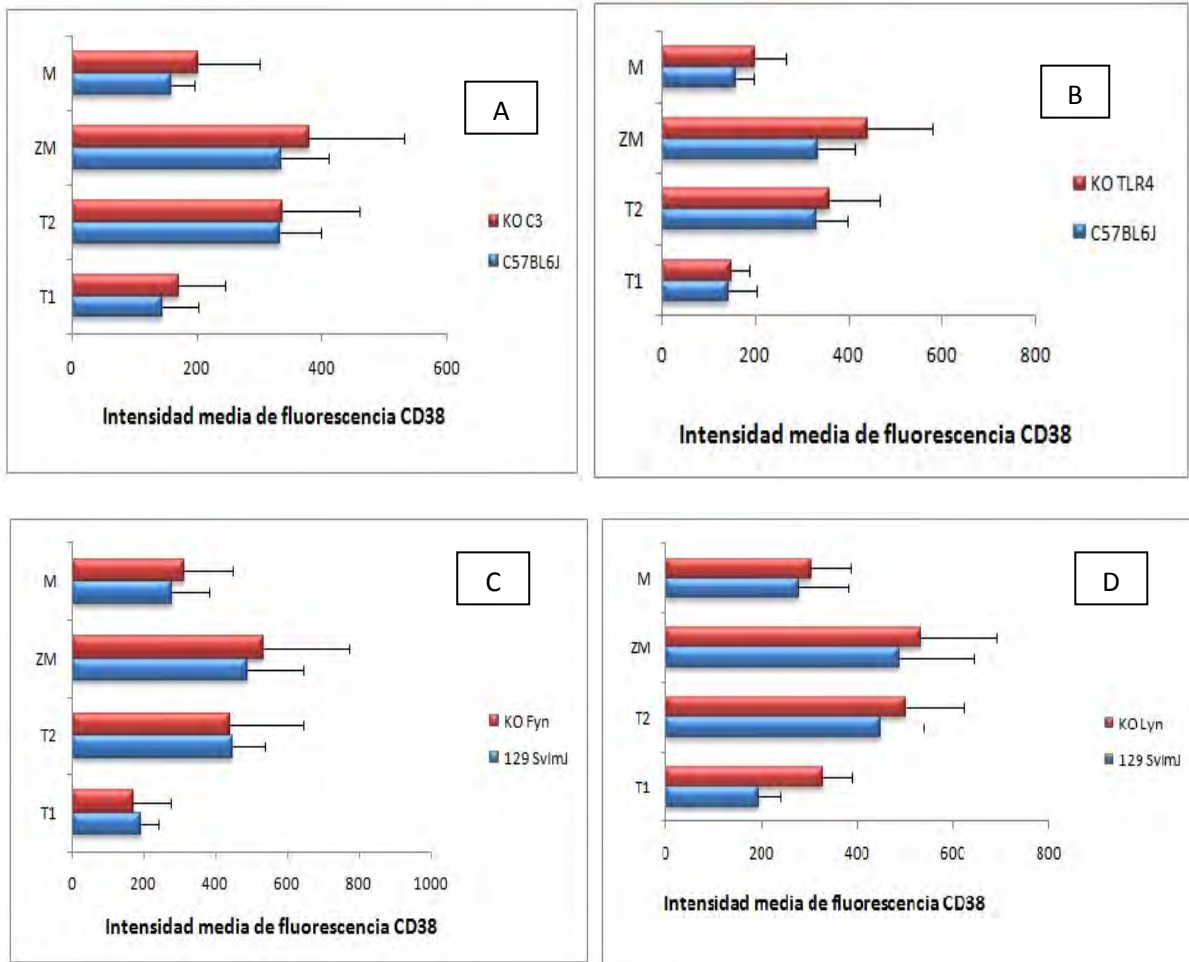


Figura 30. La incapacidad para responder frente a un estímulo con CD38 de las cepas deficientes de Lyn y Fyn es independiente de la abundancia de CD38. En A) la expresión de CD38 en la cepa “knock out” de C3, en B) expresión de CD38 para la cepa “knock out” de TLR4, en C) expresión de CD38 en la cepa “knock out” de Fyn; finalmente en D) expresión de CD38 para la cepa “knock out” de Lyn.

Contrario a lo que se esperaba, basándonos en los resultados publicados (Rodríguez-Alba,2008 y Yasue,1997) donde los ratones “knock out” de las cinasas Lyn y Fyn son incapaces de responder al estímulo con CD38, observamos que no hay diferencia significativa en la expresión de CD38 entre las cepas deficientes y la cepa silvestre, lo que sugiere que dicha incapacidad para responder, no se debe de manera directa a una disminución en la expresión de CD38.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para conocer si en ausencia de ciertas moléculas clave para el desarrollo del linfocito B (C3, TLR4, Fyn, Lyn, sIgM), la célula podría usar a CD38 como una vía alterna, en este trabajo se analizó el número de células en cada estadio de maduración, así como también la expresión de CD38, en ratones deficientes para cada una de estas moléculas.

CD38 se expresa en la membrana del linfocito B desde las etapas más tempranas de su maduración en médula ósea y diversos estudios se han publicado donde se ponen de manifiesto los diversos efectos biológicos del entrecruzamiento de CD38 (Manjarrez-Orduño,2007;Rodriguez-Alba,2008; Lund,2008). Otros estudios, nos hablan también de los efectos biológicos de las moléculas clave antes mencionadas, sin embargo no se había realizado un análisis a detalle de la ausencia de dichas moléculas y su repercusión en el número de células en cada estadio, así como en la abundancia de CD38.

Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo fue analizar el número total de células en cada estadio de la ontogenia del linfocito B, así como la expresión de CD38 en cada uno de ellos, en las distintas cepas de ratones “knock out”.

De manera general, CD38 se expresa desde los primeros estadios de maduración del linfocito B pero su expresión varía conforme el linfocito B va madurando, por ejemplo se observa que la intensidad media de fluorescencia de CD38 aumenta conforme el linfocito B madura en la médula ósea, a excepción del ratón IgM donde la intensidad media de fluorescencia decae de manera significativa desde el estadio de pro-B. Mientras que en el bazo, el estadio que presenta la mayor intensidad media de fluorescencia son los linfocitos B de zona marginal. Indicándonos que la abundancia de CD38 varía de forma diferencial conforme el estadio de maduración del linfocito B.

En un principio se reconoció a los receptores tipo Toll como únicos de células del sistema inmune innato, pero ahora sabemos que células como linfocitos T y B los expresan en su superficie. Aunque es bien conocido el papel de los receptores tipo Toll en linfocitos B maduros en la respuesta frente a antígenos T-independientes, promoviendo la proliferación y diferenciación hacia células secretoras de anticuerpos, poco se conoce del papel de dichos receptores durante las etapas más tempranas del desarrollo. Ahora sabemos que en dichos estadios, los linfocitos B expresan TLR4, son capaces de responder a LPS, diferenciarse a células IgM⁺ y de llevar a cabo cambio de isotipo, independientemente de la expresión de un BCR (Hayashi, 2005; Melamed, 2008). Se esperaría pues, que la deficiencia de dicha molécula, tuviera repercusiones en el desarrollo del linfocito B, sin embargo los resultados sugieren que, a pesar de tener la capacidad de ser activados vía TLR4, dicho receptor no es esencial en la maduración del linfocito B, en las primeras etapas de maduración (médula ósea) pues no se observan diferencias significativas respecto la cepa control. En cuanto a bazo, se observa un número significativamente menor de linfocitos B transicionales y linfocitos B maduros, sugiriendo una participación de TLR4 en la maduración a estos dos niveles. Una posible explicación de dicha participación es a través del papel que juega el TLR en el rescate de apoptosis de estas poblaciones y la otra se debe a que células del sistema inmune innato también expresan el receptor en su superficie, tales como el caso de las células dendríticas, estas células reciben las señales a través de TLR's, presentan el antígeno y activan al linfocito T, que a su vez es capaz

de secretar citocinas que promueven, entre otras cosas, la proliferación de las células B. Sin embargo, para concluir de qué modo la molécula participa en el desarrollo del linfocito B, se requiere llevar a cabo ensayos de funcionalidad, tal como estimular linfocitos B purificados de ambas cepas (tanto la silvestre como la “knock out”) con distintos ligandos para TLR4 y monitorear la señalización a través del TLR mediante sus moléculas adaptadoras, principalmente Myd88; así como el resultado final, es decir, la producción de anticuerpos, cuando el estímulo se acompaña de un antígeno. Este último es un tema de debate, pues mientras algunos aseguran que la señalización vía TLR es necesaria para la producción de anticuerpos, otros dicen que es posible montar una respuesta humoral en ausencia de dichas señales; sin embargo, la teoría mejor aceptada hoy día es que las señales vía TLR aumentan la producción de anticuerpos específicos pero no son necesarias para inducir la respuesta de anticuerpos (Rawlings, 2007). Por otro lado estos modelos clásicos de estudio solo reflejan una pequeña parte de lo que pasa en respuesta a antígenos bacterianos. Cervantes en el 2009 utilizó el modelo de porinas de *S. typhi*, pues estas moléculas son capaces de generar una respuesta humoral de larga vida, encontrando que la expresión de TLR4 y TLR2, así como sus adaptadores Myd88 y TRIF, son importantes y contribuyen de modo diferencial en la respuesta inmune humoral de tipo IgM e IgG. Así pues, la expresión de TLR4 es importante durante la inducción de una respuesta primaria de tipo IgM, mientras que la expresión de TLR2 lo es para una respuesta tipo IgG (Cervantes, 2009).

Por otro lado, en la figura 29, panel B y en la figura 30 panel B, pareciera que la abundancia de CD38 es menor en el caso de las células de médula ósea y mayor para las células de bazo, en la cepa “knock out” de TLR4, sin embargo esta diferencia no es significativa comparado con la cepa silvestre, por otro lado cabe notar que la desviación estándar para ambas figuras es muy grande por lo que se recomienda aumentar la n de estudio. Sin embargo, no podemos descartar una posible asociación de TLR4 y CD38 pues el ensayo realizado es meramente sugestivo, para resultados concluyentes se sugieren ensayos de colocalización tales como la microscopía confocal y la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia FRET, que nos permite conocer la distancia entre dos moléculas fluorescentes cuando la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra (Caorsi, 2008)., ensayos de coinmunoprecipitación; así como ensayos de funcionalidad, donde en ausencia de una molécula se observa la respuesta a un estímulo determinado (CD40, LPS, anti-IgM, CD38) ya sea en ensayos de proliferación (incorporación de timidina tritiada), apoptosis (anexina-V) y/o fosforilación de proteínas (western-blott/citometría de flujo).

El sistema del complemento es un conjunto de moléculas presentes en el suero que se activan de manera secuencial y que median una serie de reacciones que potencializan la respuesta inflamatoria, facilitan la fagocitosis y dirigen la lisis de las células. Se activa por tres distintas vías, desembocando todas en el producto principal que es C3. Se ha demostrado que la ausencia de dicho producto juega un rol importante en la susceptibilidad frente estreptococos del grupo B y otros microorganismos encapsulados, debido a una falla en el proceso de opsonización aun en ausencia de anticuerpos específicos contra dichos microorganismos. Así mismo, C3 actúa en sinergismo con los anticuerpos específicos mediando la opsonofagocitosis por células natural killers. De tal forma que el complemento estaría participando en procesos que comprenden tanto la inmunidad innata como adaptativa (Wessels, 1995). Es bien conocido el papel que tiene como potenciador de la respuesta inmune, pues la asociación

del complejo receptor del complemento con el BCR disminuye el umbral de activación del linfocito B, sin embargo, existe evidencia de que también puede proveer una señal de supervivencia para el linfocito B durante la reacción de centro germinal. (Carroll, 1998). Por otro lado, existen pocos estudios donde se haya analizado su papel sobre la ontogenia de la célula B, por lo tanto nos preguntamos si el porcentaje, tanto como el número total de células en cada estadio de maduración en ausencia de esta molécula podría variar. Cuando Hasewaga y colaboradores (2001) analizaron el número total de linfocitos B de bazo en ratones “knock out” de C3 no encontraron diferencias significativas, sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos, podría decirse que no es posible observar diferencia significativa porque, al analizar el número total de linfocitos B podría pasarse por alto el efecto sumatorio de un número significativamente reducido de células transicionales uno y un número significativamente mayor de células maduras. Sin embargo, es de notar la desviación estándar tan grande, por lo que se sugiere que se aumente la n. En cuanto la expresión de CD38 no se observa diferencia significativa, aun así no podríamos descartar una posible asociación de C3 y CD38 pues el ensayo realizado solo es sugestivo, por lo que se sugiere llevar a cabo ensayos más concluyentes, como los antes mencionados.

En nuestro laboratorio, previamente se analizó el porcentaje de células de cada estadio de maduración en bazo del ratón “knock out” de CD38 (Rodríguez- Alba, 2008), encontrándose un número reducido de linfocitos B transicionales dos y un arresto (número mayor) de linfocitos B transicionales uno; sin embargo no se había llevado a cabo dicho análisis para las primeras etapas de maduración, donde nuestros resultados sugieren que CD38 no es esencial en el desarrollo del linfocito B en médula ósea, pues tanto los porcentajes, como los números totales de células permanecen sin cambios respecto a la cepa silvestre. Estos datos resaltan que CD38 no sólo se expresa de forma diferencial dependiendo del estadio de maduración, si no que los procesos de maduración a través de CD38 también cambian conforme el linfocito B madura, así no se observan diferencias en médula ósea pero sí en estadios de maduración más avanzados, como es el caso de los linfocitos B de bazo.

Dos moléculas muy importantes en el desarrollo del linfocito B, son las tirosina cinasas de la familia de cinasas Scr, Lyn y Fyn pues están implicadas en la transducción de señales a través del BCR. Ferry y colaboradores (2005) encontraron que tanto el ratón “knock out” de CD22 como de la cinasa Lyn, tienen un número significativamente reducido de linfocitos B de zona marginal, se piensa que dicha reducción es un reflejo de las alteraciones en la señalización del BCR. Las células de bazo, del ratón “knock out” de Lyn, frente al estímulo con un antígeno se diferencian rápidamente hacia células plasmáticas. Por otro lado, no se observa diferencia significativa en lo que respecta a maduración del linfocito B hasta el estadio de B inmaduras, confirmando la observación de que dicha cinasa no es esencial para el desarrollo del linfocito B hasta mencionado punto (Ferry, 2005). En lo que se refiere a Fyn, mucho se ha publicado de esta cinasa, acerca de su papel en el desarrollo de autoinmunidad y la incapacidad de las células del ratón “knock out” para proliferar frente un estímulo con CD38 (Yu, 2003; Rodríguez-Alba, 2008), pero poco se sabía del número de células en cada estadio: al igual que en el ratón “knock out” de la cinasa Lyn, observamos un número significativamente reducido de linfocitos B de zona marginal, esto era de esperarse pues ambas cinasas juegan un rol muy importante en la transducción de señales a través del BCR. . Contrario a lo que se esperaba, basándonos en los resultados publicados (Rodríguez-Alba, 2008 y Yasue, 1997), donde los “knock out” de las cinasas Lyn y Fyn son incapaces de responder al estímulo con

CD38, observamos que no hay diferencia significativa en la expresión de CD38 entre las cepas deficientes y la cepa silvestre, lo que sugiere que dicha incapacidad para responder, no se debe de manera directa a una disminución en la expresión de CD38.

Un dato curioso es aquel obtenido en la cepa B10.129S2(B6)-*Igh-6^{tm1Cgn}*/J. Este ratón transgénico tiene linfocitos B que no secretan IgM pero que la expresan unida a su membrana, lo que permite aplicar la clasificación de Hardy y Hayakawa (2001) y distinguir un número determinado de células B inmaduras. En concordancia a lo reportado en la literatura (Boes, 1998), se observa un número significativamente mayor de linfocitos pre-pro B, pero contrariamente se observa un número significativamente menor de células B inmaduras, sin embargo, cabe mencionar que la clasificación usada por los autores difiere de aquella utilizada en nuestros experimentos, ya que los primeros consideran una sola fracción de células pro-B y pre-B que son B220^{low} e IgM⁻ y una sola fracción que engloba células inmaduras y maduras (B220⁺ e IgM⁺). Aunque Boes y colaboradores aseguran que no se afecta la maduración del linfocito B en médula ósea, después de un mes de edad, en estos ratones, nuestros resultados sugieren lo contrario. Es de notar, que solo en esta cepa se observó una diferencia significativa en cuanto a la expresión de CD38 comparada con la cepa silvestre, sugiriendo una posible relación entre CD38 e IgM.

En perspectiva, podrían aislarse las células de médula ósea de dicha cepa, cultivárselas en un medio apropiado (con todos los factores de supervivencia necesarios para dichas células) y realizar sobre ellas ensayos de funcionalidad, como lo son de proliferación, apoptosis y fosforilación de proteínas en respuesta a diferentes estímulos: CD40, LPS, anti-IgM y por supuesto, CD38; así como una posible combinación de estímulos.

CONCLUSIONES

El análisis del desarrollo del linfocito B en médula ósea de las distintas cepas de ratones “knock out” muestra que dichas moléculas (CD38, C3, TLR4, Lyn, Fyn, sIgM), aunque participan en la ontogenia del linfocito B, no son esenciales en las primeras etapas de desarrollo, pues los números totales de células son prácticamente los mismos que aquellos obtenidos por la cepa control; a diferencia de la maduración en bazo, donde se observa que la ausencia de las moléculas en estudio repercute, cada una de ellas, en un determinado estadio de maduración, lo cual se observa a través de un número significativamente reducido o elevado de células en cada estadio.

Por otro lado, la expresión de CD38 cambia diferencialmente conforme el estado de maduración y o activación del linfocito B, siendo las células de zona marginal las que presentan una mayor abundancia de esta proteína. Aunque se esperaba observar algún cambio en la expresión de CD38, sólo en la cepa B10.129S2(B6)-*Igh-6^{tm1Cgn}*/J se observó un cambio significativo, estos resultados son sugestivos de una posible relación de CD38 con IgM, sin embargo, para que estos resultados sean concluyentes es necesario llevar a cabo otro tipo de ensayos tal como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), como ya se mencionó en la discusión.

ANEXOS

ANEXO I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Extracción de DNA a partir de tejidos.

Agente de lisis alcalina:

Reactivo	[Final]	Añadir	De
NaOH	25mM	125 μ l	10N NaOH
EDTA	0.2mM	20 μ l	0.5M EDTA

1. Añadir 40 ml de agua bidestilada.
2. Ajustar el pH a 12.
3. Aforar con agua bidestilada a 50 ml.

Buffer de Neutralización:

Reactivo	[Final]	Añadir	De
Tris-HCl	40mM	325mg	Tris-HCl

1. Añadir 40 ml de agua bidestilada.
2. Ajustar pH a 5.
3. Aforar con agua bidestilada a 50 ml.

Solución de lisis de eritrocitos para Bazo

Reactivo	[Final]	Añadir	De
NH ₄ Cl	0.15M	8.29g	NH ₄ Cl
KHCO ₃	10mM	1g	KHCO ₃

EDTA	100 μ M	37.2mg	EDTA
------	-------------	--------	------

1. Ajustar pH a 7.4
2. Ajustar volumen a un litro, con agua destilada.

Solución de lisis de eritrocitos para Médula Ósea

Reactivo	[Final]	Añadir	De
Trizma base	0.02M	0.243g	Trizma Base

1. Disolver en 90 ml de agua destilada.
2. Ajustar pH a 7.5 con HCl
3. Aforar a 100 ml con agua destilada.

Reactivo	[Final]	Añadir	De
NH ₄ Cl	0.15M	0.83g	NH ₄ Cl

4. Pesar el NH₄Cl y disolver en 90 ml de Trizma base 0.02M.
5. Ajustar pH a 7.2.
6. Aforar a 100 ml con Trizma base 0.02M.

PBS 10 X

Reactivo	Añadir
NaCl	80g
KH ₂ PO ₄	2g
*Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	20g
Na ₂ HPO ₄	11.5g
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	21.7g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	14.24g

KCl	2g
H ₂ O	950 ml

***Dependiendo del fosfato de sodio con el que se cuenta en el laboratorio**

1. Ajustar pH a 7.4
2. Aforar a un litro con agua destilada

PBS 1X

1. Colocar la décima parte del volumen total de PBS 10X
2. Aforar a un litro con agua destilada

PBA

Reactivo	[Final]	Añadir	De
NaN ₃	0.01%	0.2ml	NaN ₃ 10%
Albúmina	0.1%	0.2g	Albúmina

1. Aforar a 200 ml con PBS 1X

TAE 50X

Reactivo	[Final]
Tris Base	1 M
Ácido acético	1 M
EDTA	0.05 M

1. Ajustar pH a 8.3

TAE 1X

1. Añadir 2 ml de TAE 50X a 100 ml de agua destilada.
2. Para un litro, añadir 20 ml de TAE 50X.

PBS-SFB 3%

1. Añadir 3% del volumen total de suero fetal bovino en PBS 1X.

Gel de Agarosa 2%

1. Pesar 2 g de Agarosa grado analítico.
2. Disolver en 100 ml de TAE 1X.

Fix-FACS

1. Añadir 1% del volumen total de formaldehído en PBS 1X.

EDTA 0.5M

Reactivo	[Final]
EDTA	0.05M

1. Ajustar pH a 7.2

ANEXO II. IDENTIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE MADURACIÓN Y ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA DE CD38.

II.A. MÉDULA ÓSEA

En una gráfica de tamaño contra granularidad, se elige la región correspondiente a los linfocitos, sobre dicha región se realiza una gráfica de B220 contra CD43; en la fracción B220⁺CD43⁻, encontraremos las células pre-B y B inmaduras, mientras que en la fracción B220⁺CD43⁺ encontramos las formas más inmaduras pre-pro-B y pro-B.

Para poder distinguir los 4 estadios mencionados arriba, nos valemos de la expresión de CD19 e IgM: pre-pro-B (B220⁺CD43⁺CD19⁻IgM⁻), pro-B (B220⁺CD43⁺CD19⁺IgM⁻), pre-B (B220⁺CD43⁻CD19⁺IgM⁻), B inmaduras (B220⁺CD43⁻CD19⁺IgM⁺)

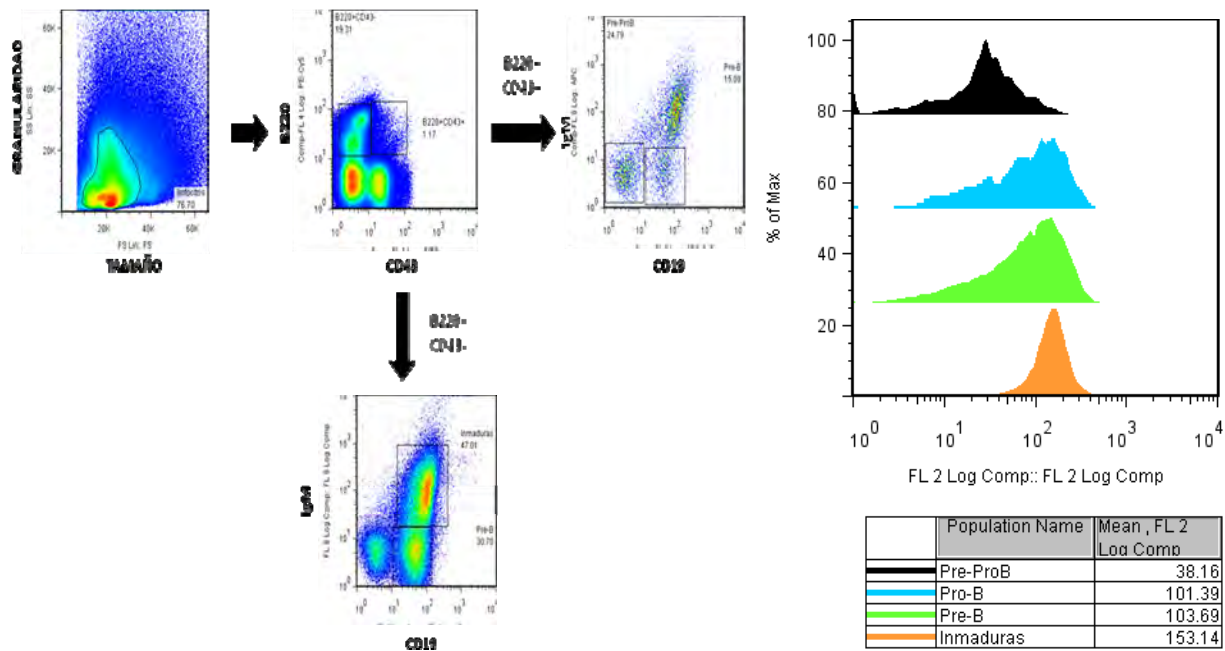


Fig. 31 Identificación de los estadios de maduración en médula ósea

II.B. BAZO

Se hace una gráfica de tamaño contra granularidad, donde se elige la región que corresponde a los linfocitos, de nuestro interés son los linfocitos B220+ pues es la población de linfocitos B, sobre ellos se distinguen tres subpoblaciones cuando se analiza la gráfica CD24 contra CD48, por último, los linfocitos B de zona marginal pueden identificarse por la expresión de CD23. (De acuerdo a materiales y métodos). De cada estadio así definido se hace un histograma de la intensidad media de fluorescencia de CD38, empalmando todos en una sola gráfica.

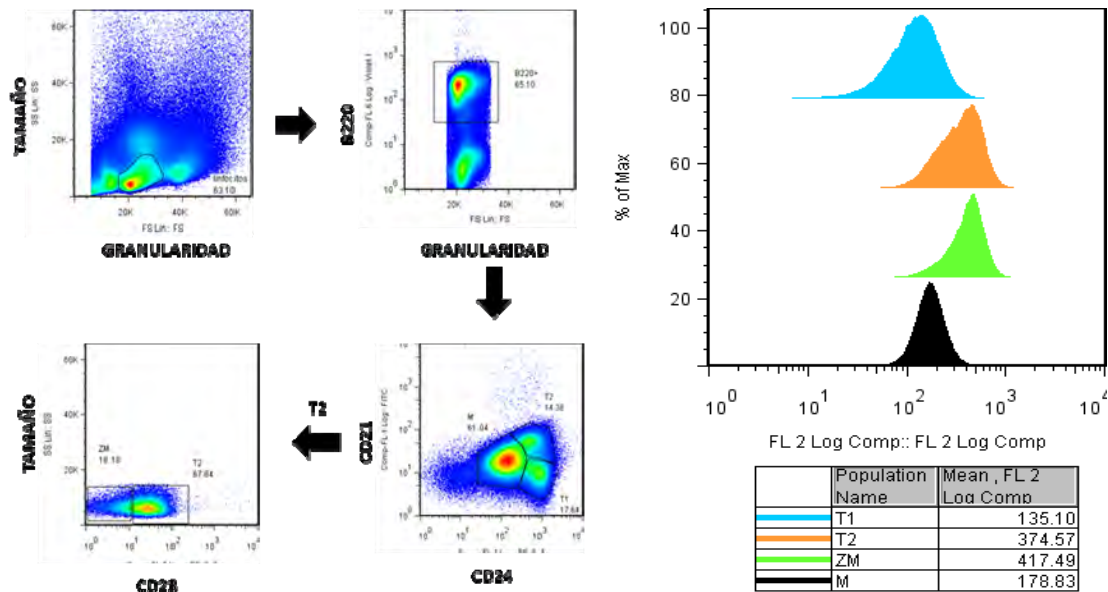


Fig.32 Identificación de estadios de maduración en bazo

ANEXO III. METODOLOGÍAS EN EXTENSO

Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de ratones transgénicos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular para amplificar ya sea una sola o pocas copias de DNA en varios órdenes de magnitud de forma exponencial.

Fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis y ahora es una técnica muy utilizada para una variedad de técnicas: clonación y secuenciación de DNA, estudios filogenéticos, enfermedades de tipo hereditario, medicina forense y en estudios de paternidad, así como en la detección de agentes patógenos. (Yamamoto, 2002)

Para montar una PCR se necesitan ciertas condiciones y reactivos:

1. DNA molde, que contiene la región que se desea amplificar.
2. Los iniciadores, que son complementarios a los extremos 3' sentido y anti-sentido del DNA que se desea amplificar, de tal manera que flanquean secuencia a amplificar.
3. DNA polimerasa, con una temperatura óptima de 70°C, la más comúnmente utilizada es la *Taq Polimerasa*.
4. Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), que sirven de sustrato para polimerizar nuevo DNA.
5. Iones divalentes, tal es el caso de Mg^{2+} y Mn^{2+} .

6. Iones monovalentes como el potasio.
7. Un buffer que mantiene el pH necesario para un funcionamiento adecuado de la enzima.

Una PCR convencional suele constar de los siguientes pasos:

- A. Iniciación: consiste en aumentar la temperatura de reacción hasta 94-96°C, esto, para las DNA polimerasas que requieren activación por calor.
- B. Desnaturalización: consiste en calentar la reacción a una temperatura entre 94-98°C por 20 o 30 segundos, lo que causa que el DNA molde se desnaturalice mediante la disrupción de los puentes de hidrógeno existentes entre bases complementarias, generando hebras sencillas de DNA.
- C. Alineamiento del iniciador: la temperatura es reducida a 50-65°C, por 20 o 40 segundos, lo que permite que los iniciadores se unan a su secuencia complementaria en el DNA molde. Típicamente la temperatura de alineación suele ser 3 o 5 grados Celsius menor que la Tm de los iniciadores. La polimerasa se une a este híbrido molde- iniciador y comienza la síntesis de DNA. (Hecker,1996)
- D. Elongación de la cadena: la temperatura dependerá de la polimerasa utilizada, esta última sintetiza una nueva hebra de DNA molde añadiendo dNTP's complementarios en dirección 5' a 3', condensando el grupo 5' fosfato de los dNTP's con el grupo 3' hidroxilo del final de la cadena recién sintetizada. El tiempo de extensión depende de la polimerasa usada tanto como del tamaño del fragmento que se desea amplificar.
- E. Elongación final: se lleva a cabo a 70-74°C por 5 a 15 minutos, al final del último ciclo, esto para asegurar que cualquier hebra sencilla de DNA, sea completamente extendida.
- F. "Hold": este paso, donde la temperatura se conserva de 4 a 15°C por tiempo indefinido, puede ser empleado para el almacenamiento de la reacción por un corto lapso de tiempo. (Bartlett,2003).

Citometría de Flujo para la fenotipificación de los distintos estadios de maduración del linfocito B

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico. Se basa en hacer pasar una suspensión de partículas alineadas delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a distintos parámetros de la célula. Estas señales son recogidas por distintos detectores y se convierten en señales electrónicas que serán digitalizadas en forma de gráficos.

Se compone de tres sistemas: el sistema de fluidos, el sistema óptico y el sistema electrónico. El sistema de fluidos transporta las células al centro del láser de una en una, el que las células pasen alineadas por el láser es esencial para que las poblaciones sean bien definidas.

Las señales que se producen por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

- ✓ Señales de dispersión: relacionadas con características intrínsecas de la célula, como son su tamaño y la complejidad del núcleo y citoplasma.
- ✓ Señales de fluorescencia: relacionadas con las características antigénicas de cada célula, como es el caso del inmunofenotipo.

A su vez, las señales de dispersión, se dividen en dos:

- ✓ La luz dispersada en un ángulo cónico pequeño (0-10°), llamada "Forward Scatter (FSC)", que es una medida proporcional al tamaño relativo de la partícula que produce la dispersión.
- ✓ La luz dispersada en ángulo recto, "Side Scatter (SSC)", proporcional a la complejidad relativa de la estructura interna de la partícula. (Invitrogen, 2010)

Por otro lado, las señales de fluorescencia se valen del principio químico en el que una molécula, llamada fluorocromo, absorbe luz a una determinada longitud de onda y emite a una longitud superior. El término inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. La propiedad de los anticuerpos para unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco, permite su utilización como herramientas en la investigación clínica. (Barrera, 2004)

El uso de anticuerpos monoclonales en citometría de flujo permite la identificación de marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular en particular, el diagnóstico de muchas enfermedades, análisis funcional de moléculas en la superficie celular, diagnóstico y tratamiento de tumores y en el estudio de los procesos de interacción hospedero-agente infeccioso. (Machado, 2006)

Abbas K.A., Lichtman H.A., Pober S. J. 2002 *Inmunología Celular y Molecular*. 4ª edición. Editorial McGraw- Hill Interamericana. España. Pags. 29,30 y 189-215

Abbas K.A., Lichtman H.A., Pober S. J. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier. Estados Unidos

Auerbach AB, Norinsky R, Ho W, Losos K, Guo Q, Chatterjee S, Joyner AL. 2003. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res.* 12: 59-69

Barrera R.L., Drago S.M., Pérez R. J., Zamora C.A., Gómez A.F., Sainz E.T., Mendoza P.F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.* 17(1): 42-55

Batista FD, Iber D, Neuberger MS. 2001. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature.* 411: 489-494.

Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 2001. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* 291: 447-450.

Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J. 1998. Enhanced B-1 Cell Development, But Impaired IgG Antibody Responses in Mice Deficient in Secreted IgM. *J Immunol.* 160: 4776-4787

Caorsi V. 2008. *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Nanomeric Rulers*, tomado del libro *Confocal Microscopy*. Leica Microsystems.

Carlson, Bruce. 2009. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 4ª ed., Ed. Elsevier

Carroll C.M, Kelsoe G, Goodnow C.C, Prodeus P.A, Shen L, Goerg S, Fischer B.M. 1998. Dependence of Germinal Center B Cells on Expression of CD21/CD35 for Survival. *Science.* 280:582-585.

Castejón R, Vargas JA, Romero Y, Briz M, Muñoz RM, Durántez A. 1999. Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry.* 38(5):224-30.

Ceredig R., Rolink G.A., Brown G. 2009. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol.* 9:293- 300

Cervantes- Barragan L, Gil-Cruz L, Pastelin-Palacios R, Lang SK, Isibasi A, Ludewig B, Lopez-Macías C. 2009. TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to *Salmonella typhi* antigens. *Eur J Immunol.* 39:126-135.

Cornall RJ, Cyster JG, Hibbs ML, Dunn AR, Otipoby KL, Clark EA, Goodnow CC. 1998. Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity.* 8:497–508.

D'Arena G., Musto P., Cascavilla N., Dell'Olio M., Di Renzo N., Perla G., Savino L., Carotenuto M. 2001. CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 42:109-114.

Deaglio S., Capoblanco A., Bergui L., Durig J., Morabito F.m Duhrsen U., Malavasi F. 2003. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 102: 2146-2155.

Deaglio S., Vaisitti T., Bergui L., Bonello L., Horenstein AL., Tamagone L., Boumsell L., Malavasi F. 2005. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*. 105: 3042-3050.

Deaglio S., Vaisitti T., Billington R., Bergui L., Omede P., Genazzani A., Malavasi F. 2007. CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood*. 109(12):5390-5398.

Deaglio S., Aydin S., Grand M., Vaisitti T., Bergui L., D'Arena G., Chiorino G., Malavasi F. 2010. CD38/CD31 Interactions Activate Genetic Pathways Leading to Proliferation and Migration in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Mol Med*. 16(3-4): 87-91.

Depoil D, Fleire S, Treanor BL, Weber M, Harwood NE, Marchbank KL, Tybulewicz VL, Batista FD. 2008. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol*. 9: 63-72.

Depoil D., Weber M., Treanor B., Fleire J.S., Carrasco R. Y., Harwood E. N., Batista D.F. 2009. Early Events of B Cell Activation by Antigen. *Science Signaling*. 2(63): 1-5

Dianzani U, Fuanro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, Buonfiglio D, De Monte LB, Pileri A, Malavasi F. 1994. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol* 153: 952-959.

Dong HY. et al. 2005 B-cell specific activation protein encoded by the PAX-5 gene is commonly expressed in Merkel cell carcinoma and small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 29(5):687-92

Drake LR. 2005. Gray: **Anatomía para estudiantes. Editorial El Servier. España.**

Edwards JC, Cambridge G. 2006. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 6:394-403

Ferry H, Cockford LT, Silver K, Rust N, Goodnow CC, Cornall JR. 2005. Analysis of Lyn/CD22 double-deficient B cells in vivo demonstrates Lyn- and CD22-independent pathways affecting BCR regulation and B cell survival. *Eur J Immunol*. 35: 3655-3663.

Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS, Carroll MC. 1996. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol*. 157(2):549-56.

Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhiman JE, Noelle RJ. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand. *Annu Rev Immunol*. 14:591-617.

Funaro a, Malavasi F. 1999. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents*. 13:54-61.

- Gauld BS, Cambier CJ.** 2004. Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene*. 23: 8001–8006
- Glaser S., Anastassiadis K., Stewart F.** 2005. Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet*. 37(11):1187-1193.
- Gold MR, de Franco AL.** 1994. Biochemistry of B lymphocyte activation. *Adv Immunol*. 55:221-295.
- Haas KM., Tedder TF.** 2005. Role of the CD19 and CD21/35 receptor complex in innate immunity, host defense and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol*. 560: 125-39.
- Hardy RR, Carmack EC, Shinton AS, Kemp JD, Hayakawa K.** 1991. Resolution and Characterization of Pro-B and Pre-Pro-B Cell Stages in Normal Mouse Bone Marrow. *J Exp Med*. 173: 1213-1225.
- Hardy, R. R., and Hayakawa, K.** 2001. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol*. 19, 595–621.
- Hasegawa M., Fujimoto M., Poe C.J., Steebar A.D., Tedder F.T.** 2001. CD19 Can Regulate B Lymphocyte Signal Transduction Independent of Complement Activation. *J Immunol*. 167:3190-3200.
- Hayashi AE, Akira S, Nobrega A.** 2005. Role of TLR in B Cell Development: Signaling through TLR4 Promotes B Cell Maturation and Is Inhibited by TLR2. *J Immunol*.174:6639-6647
- Hecker KH, Roux KH.** 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*. 20(3):478-85.
- Houdebine L-M.** 2005. Use of Transgenic Animals to Improve Human Health and Animal Production. *Reprod Domest Anim*. 40: 269-281
- Invitrogen.** 2010. Introduction to Flow Cytometry. Disponible en Internet a través de la página: http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html
- Jakob A., Doll J., Schulte-Monting J., Hirsch FW.** 2006. Retrospective analysis of CD38 expression in 102 patients with B-CLL with maximum follow-up of 18 years incidence and prognostic significance. *Onkologie*. 29: 437-441.
- Kitanaka A., Ito C., Coustan-Smith E., Campana D.** 1997. CD38 Ligation in Human B Cell Progenitors Triggers Tyrosine Phosphorylation of CD19 and Association of CD19 with Lyn and Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J Immunol*. 159:184-192.
- Klein U., Dalla-Favera R.** 2008. Germinal centers: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 8: 22-33.
- Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, et al.** 2010. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*. 120: 214-22.

Kuppers R, Dalla-Favera R. 2001. Mechanism of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 20:5580-94

LeBien TW, Tedder TF. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 112:1570-80.

Lee H.C. 2006. Structure and Enzymatic functions of Human CD38. *Mol Med*. 12(11-12):317-323.

Liu Q.X., Hart N.J. D., MacPherson G.G., Good F.M., Wykes N.M. 2008. Soluble CD38 significantly prolongs the lifespan of memory B-cell responses. *Immunology*. 125: 14-20

Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige JC, Sideras P, Torres R, Lamers CM, Carsetti R. 1999. B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor-derived Signal. *J Exp Med*. 190: 75-89

Lund E.F. 2006. Signaling Properties of CD38 in the Mouse Immune System: Enzyme-dependent and – independent Roles in Immunity. *Mol Med*. 12(11-12):328-333.

Machado P.N., Alberto T.G., Carlos C. J. 2006. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*. 10(3): 186-197.

Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horestein A, Calosso L, Mehta K. 1994. CD38: a glycoprotein in search of a function . *Immunol Today*. 15:95-97

Malavasi F., Deaglio S., Ferrero E., Funaro A., Sancho J., Ausiello M.C., et al. 2006. CD38 and CD157 as Receptors of the Immune System: A Bridge Between Innate and Adaptative Immunity. *Mol Med*. 12(11-12): 334-341.

Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein L.A., Ortolan E., Vaisitti T., Aydin S. 2008. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Phys Rev*. 88: 841-886.

Mallone R., Perin C. P. 2006. Anti-CD38 autoantibodies in type 2 Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 22(4):284-294.

Mandels TE, Phipps RP, Abbot A, Tew J. 1980. The follicular dendritic cell: Long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev*. 53:29-59.

Manjarrez-Orduño N.,Moreno-García M., Fink K., Santos-Argumedo L. 2007. CD38 cross-linking enhances TLR-induced B cell proliferation but decreases IgM plasma cell differentiation. *Eur J Immunol*. 37: 358-367.

Marchbank KJ, Kulik L, Gipson MG, Morgan BP, Holers VM. 2002. Expression of human complement receptor type 2 (CD21) in mice during early B cell development results in a reduction in immature B cells and hypogammaglobulinemia. *J Immunol*. 169: 3526-35.

Mayani H, Flores- Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores- Guzmán P, Chávez-González A. 2007. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2:95-107.

McKensie. *Hematología Clínica*. 2ª edición. Editorial El Manual Moderno. México. 2000. Pags. 13-23

Melamed D., Azulay-Debby H., Edry E. 2008. TOLL-like receptor ligands stimulate aberrant class switch recombination in early B cell precursors. *Int Immunol*. 20(12): 1575-1585.

Moreno-García M., López- Bojórques L., Zentella A., Humphries L., Rawlings D., Santos-Argumedo L. 2005. CD38 Signaling Regulates B Lymphocyte Activation via a Phospholipase C (PLC)- γ -Independent, Protein Kinase C, Phosphatidylcholine-PLC, and Phospholipase D-Dependent Signaling Cascade. *J Immunol*. 174: 2687-2695.

Moore KL. 2002. *Anatomía con orientación clínica*. 4ta edición. Editorial Panamericana.

Nagasawa. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*. 6: 107-116

Nemazee D., Weigert M. 2000. Revising B cell receptors. *J Exp Med*. 191:1813-7.

Novina CD, Sharp PA. 2004. The RNAi revolution. *Nature*. 430: 161-164.

Pape K, Catron D, Itano A, Jenkins M. 2007. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity*. 26:491-502

Qi H, Egen JG, Huang AY, Germain RN. 2006. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science*. 312:1672-1676.

Quintanar- Escorza MA, Calderón-Salinas JV. 2006. Eriptosis, la apoptosis del eritrocito. *Revista de Educación Bioquímica*. 25(3): 85-89.

Ramírez OM, Cornejo G. 2004. Fisiología de la hematopoyesis. *Pediatría Integral*. VIII(5):377-382.

Rawlings. J.D., Khim S., Meyer- Bahlburg A. 2007. B cell-intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J Exp Med*. 204:3095-3101.

Reyes M. T. 2010. Comparación en la producción de anticuerpos monoclonales (Mab) por el método convencional y un biorreactor de fibra hueca. Tesis de licenciatura. Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan. México.

Rodriguez- Alba J.C., Moreno-García M., Sandoval-Montes C., Rosales-García V.H., Santos-Argumedo L. 2008. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. *Blood*. 111(7): 3644-3652.

Sato S, Hasewaga M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity in mice and humans. *J Immunol*. 165:6635.

Sauer B. 1998. Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Methods*. 14(4):381-392.

Schwickert TA., Lindquist RL., Shakhar G., Livshits G., Skokos D., Kosco-Vilbois MH., et al. 2007. *In vivo* imaging of germinal centers reveals a dynamic open structure. *Nature*. 446:83-7.

Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, Manoukian R, Kelley M, Hawkins N, Davy E, Shimamoto G, Beck J, Kaufman SA, Van G, Scully S, Qi M, Grisanti M, Dunstan C, Boyle WJ, Lacey DL. 2000. Characterization of osteoclast precursors in human blood. *Br J Haematol*. 111: 501-512.

Stevenson G. T. 2006. CD38 as a Therapeutic Agent. *Mol Med*. 12(11-12): 345-346.

Takahashi K, Kozono Y, Waldschmidt TJ, Berthiaume D, Quigg RJ, Baron A, Holers VM. 1997. Mouse complement receptors type 1(CR1;CD35) and type 2(CR2;CD21): expression on normal B cell subpopulations and decreased levels during the development of autoimmunity in MRL/lpr mice. *J Immunol*. 159:1557-69.

Towhig J., Kulik L., Haluszczak C., Reuter J. Rossbach A., Bull M., Holers M.V. , Marchbank J.K. 2007. Defective B Cell Ontogeny and Immune Response In Human Complement Receptor 2(CR2,CD21) Transgenic Mice Is Partially Recovered In The Absence Of C3. *Mol Immunol*. 44(13):3434-3444.

Tudor, K. S., Payne, K. J., Yamashita, Y., and Kincade, P. W. 2000. Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* 12, 335–345

Tsulamoto Y., Nagai Y., Kariyone A., Shibata T., Kaisho T., Akira S., Miyake K., Takatsu K. 2009. Toll-like receptor 7 cooperates with IL-4 in activated B cells through antigen receptor or CD38 and induces class switch recombination and IgG1 production. *Mol Immunol*. 46: 1278-1288.

Vale M. A, Schroeder W. H. 2010. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol*. 125:778-87.

Van Zelm MC, Resli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ, et al. 2006. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* . 354:1901-12

Weber M, Treanor B, Depoil D, Shinohara H, Harwood N, Hikida M, Kurosaki T, Batista F. 2008. Phospholipase C γ 2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. *J Exp Med*. 205:853-868.

Wessels R.M, Butko P, Ma M, Warren B.H, Lages L.A, Carroll C.M. 1995. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity .*PNAS* .92: 11490-11494.

Williams GT, Peaker CJ, Patel KJ, Neuberger MS. 2008. The alpha/beta sheath and its cytoplasmic tyrosines are required for signaling by the B cell antigen receptor but not for capping or for serine/threonine- kinase recruitment.*PNAS*. 91:474-478.

Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson G. 1998. Dendritic cells interact directly with naïve B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol*. 161:1313-1319.

Wykes N. M., Beattie L., Macpherson G.G., Hart N.D. 2004. Dendritic cells and follicular dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses. *Immunology*.113: 318-327.

Yamamoto Y. 2002. PCR in Diagnosis of Infection: Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(3): 508-514.

Yasue T, Nishizumi H, Aizawa S, Yamamoto T, Miyake K, Mizoguchi C, Uehara S, Kikuchi Y, Takatsu K. 1997. A critical role of Lyn and Fyn for B cell responses to CD38 ligation and interleukin 5. *PNAS.* 94(19):10307-12

Yu CC, Mamchak AA, DeFranco AL. 2003. Signaling mutations and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun.* 6:61-88.