



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**Estudio de la función de CD38 en células**

**B1 de ratón**

**TESIS**

Que para obtener el título de

licenciada en bioquímica diagnóstica

**PRESENTA**

**Diana Berenice Rios Ramirez**

**ASESOR:** Dr. Héctor Romero Ramírez

**ASESOR INTERNO:** Dr. Salvador Fonseca Coronado



**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Estudio de la función de CD38 en las células B1 de Ratón.

Que presenta la pasante: Diana Berenice Ríos Ramírez  
Con número de cuenta: 309316095 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Marzo de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
VOCAL	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
2do. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	 Erik González Ballesteros

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

# **DEDICATORIAS**

En memoria de mi abuela Soledad Morales.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM y mis profesores por la gran formación durante toda mi carrera.

A mis padres por todo su apoyo durante toda mi formación académica y personal, sin sus palabras de aliento y en ocasiones “regaños” no sería la mujer que soy ahora. Gracias por brindarme educación, sacrificios y sobre todo **amor**.

A Lalo por estar a mi lado durante todo este tiempo. Por su amor, fuerza y crítica día con día para dar lo mejor de mí.

A mis amigos: Alan, Adolfo, Yako, Daniel, Cynthia, Arely, Diana, Giovanni, Amaro, Aletz, Jebz y Charly por acompañarme durante toda esta experiencia, por apoyarme en los momentos más difíciles y por su leal amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Zayda, Ale, Vic, David, Carlitos, Daniel, Erick, Diana y Mizaél por su amistad, enseñanzas y excelentes consejos durante mi estancia.

Al Dr. Leopoldo Santos por recibirme en su laboratorio, brindarme su apoyo y amistad durante mi estancia.

Al Dr. Héctor Romero por su asesoría durante el desarrollo de mi trabajo.

# ÍNDICE

Índice .....	4
índice de Figuras .....	6
índice de tablas .....	6
Abreviaturas .....	7
Introducción .....	9
Inmunidad .....	9
Inmunidad innata .....	9
Inmunidad adaptativa .....	9
Linfocitos B .....	10
Generalidades de CD38. ....	11
ANTEDECENTES .....	15
Justificación .....	19
Hipótesis .....	20
Objetivo general .....	21
Objetivos particulares .....	21
Estrategia experimental .....	22
Metodología .....	23
Purificación del anticuerpo monoclonal NIM-R5 (anti-CD38).....	23
Animales.....	24
Obtención de células de peritoneo. ....	24
Obtención de células mononucleares a partir de bazo. ....	24
Conteo y viabilidad celular .....	24
Tinción de superficie de células para citometría de flujo .....	25
Tinción intracelular para citometría de flujo .....	26
Ensayo de proliferación con CFSE.....	26
Medición de IL-10.....	27
Análisis estadístico .....	27
Resultados .....	28
Caracterización de las subpoblaciones de células B en bazo. ....	30
Caracterización de las subpoblaciones de células B de la cavidad peritoneal. ....	30
Expresión de CD19 y B220 en las subpoblaciones de células B en cavidad peritoneal .....	30

Expresión de CD38 en linfocitos B de cavidad peritoneal.....	34
Expresión de IL-10 en linfocitos B de cavidad peritoneal. ....	35
Proliferación de las tres subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal. ....	36
Discusión .....	37
Conclusión .....	43
Perspectivas .....	44
Bibliografía .....	45
Anexo.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE LINFOCITOS B. ....	11
FIGURA 2. MAPA DE CALOR QUE REPRESENTA LA EXPRESIÓN DE MRNA DE CD38 EN TEJIDOS HUMANOS.....	12
FIGURA 3. LOS LINFOCITOS B1 TIENEN MÚLTIPLES PROGENITORES.....	11
FIGURA 4. LOCALIZACIÓN DE LINFOCITOS B1 .....	15
FIGURA 5. PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B1.....	16
FIGURA 6. INTEGRIDAD Y PUREZA DE ANTICUERPO AGONISTA ANTI-CD38 (NIMR-5).....	29
FIGURA 7. RECONOCIMIENTO INESPECÍFICO DE CD38. ....	29
FIGURA 8. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD38 EN LINFOCITOS B DE BAZO.....	31
FIGURA 9. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITOS B EN CAVIDAD PERITONEAL.....	32
FIGURA 10. PORCENTAJE Y TOTAL DE CÉLULAS EN CAVIDAD PERITONEAL. ....	33
FIGURA 11.. EXPRESIÓN DE CD19 Y B220 EN CADA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS B DE CAVIDAD PERITONEAL.....	34
FIGURA 12. EXPRESIÓN DE CD 38 EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B DE CAVIDAD PERITONEAL.....	34
FIGURA 13. EXPRESIÓN DE IL-10 INTRACELULAR DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B DE CAVIDAD PERITONEAL ANTE DIVERSOS ESTÍMULOS .....	35
FIGURA 14. PROLIFERACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B DE CAVIDAD PERITONEAL.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. LISTA DE ANTICUERPOS.....	25
TABLA 2. CUANTIFICACIÓN DE FRACCIONES PURIFICADAS DE ANTICUERPO MONOCLONAL NIMR-5 .....	28

## **ABREVIATURAS**

**AP-1** Proteína activadora 1

**BCR** receptor de célula B

**BFA** Brefeldina A

**CFSE** Éster de succinimidil-carboxifluoresceína

**Cinvestav** Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

**Cpm** cuentas por minuto

**DAM's** patrones moleculares asociados con el peligro).

**Fab** fracción de unión al antígeno

**Fc** fracción constante

**FPLC** Cromatografía Líquida de Proteínas Rápida

**IgM** Inmunoglobulina M

**IL-10** Interleucina-10

**IL-10R** Receptor de interleucina 10

**IL-4** Interleucina 4

**IMF** Intensidad media de fluorescencia

**JAK** Cinasa janus

**LPS** Lipopolisacárido

**MHC-II** Complejo principal de histocompatibilidad clase II

**miRNA's** micro RNA's

**NF-κB** Factor nuclear asociado a las cadenas ligeras de las células B

**NIM-R5** anticuerpo anti-CD38

**PAM's** patrones moleculares asociados patógenos

**PBS** Tampón fosfato salino

**PC/PLC** fosfatidilcolina/ fosfolipasa C

**PKC** Proteína cinasa C

**PLCy2** Fosfolipasa C gamma 2

**PLD** Fosfolipasa D

**PRR's** Receptores de reconocimiento de patrones

**RPMI** Medio Roswell Park Memorial Institute

**SDS-PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SM** Medio de tinción

**STAT** Traductor de señal y activador de transcripción

**TLR** Receptor tipo Toll

**UPEAL** Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio

# **INTRODUCCIÓN**

## **Inmunidad**

Durante muchos años se ha estudiado la capacidad del sistema inmune para mantener la homeostasis de un individuo mediante mecanismos de reconocimiento de antígenos, función efectora, regulación de respuesta y memoria (Murphy, P; 2016).

Las diferentes respuestas del sistema inmune suelen dividirse en innata y adaptativa, cada una se compone de células y moléculas diferentes pero las dos tienen el mismo propósito, por ello es que suelen trabajar en conjunto para eliminar a un agente infeccioso o célula maligna.

## **Inmunidad innata**

La función principal de la respuesta innata es el reconocimiento de patrones moleculares asociados a agentes infecciosos (PAMP's) y aquellos a asociados a daño (DAMPs). Éstos, a su vez, serán reconocidos por los receptores de daño (PRR's) lo que generara una serie de mecanismos como: opsonización, fagocitosis, activación de vías de transducción de señales que generarán la producción de proteínas mensajeras principalmente citocinas y quimiocinas (Roitt, H; 2014).

Las citocinas son un grupo de proteínas que tienen efectos pleiotrópicos como la capacidad de activar otras células, inducir la diferenciación y aumentar la actividad microbicida. Por otro lado, las quimiocinas fungen como factores quimiotácticos que ayudan a establecer un camino guía para reclutar células del sistema inmunitario al sitio de infección. Generando así el proceso de inflamación que genera las señales de alarma para que se inicie la respuesta inmune adaptativa (Murphy, P; 2016).

## **Inmunidad adaptativa**

En esta inmunidad se llevan a cabo mecanismos efectores para eliminar por completo a agentes patógenos, por medio de dos respuestas denominadas humoral y celular, cabe mencionar que estas respuestas son específicas y generan memoria para posteriores exposiciones a ese antígeno (Roitt, H; 2014).

La inmunidad humoral se compone de moléculas que reciben el nombre de anticuerpos, secretados por las células plasmáticas que provienen de la diferenciación de los linfocitos B. Dichos anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas y ligeras, conformados por dos fracciones: Fc y Fab. Ambas cadenas poseen regiones constantes y variables estas últimas conforman el sitio de unión al antígeno. Las funciones principales de estos anticuerpos son la neutralización, la opsonización y la fijación del complemento (Murphy, P; 2016).

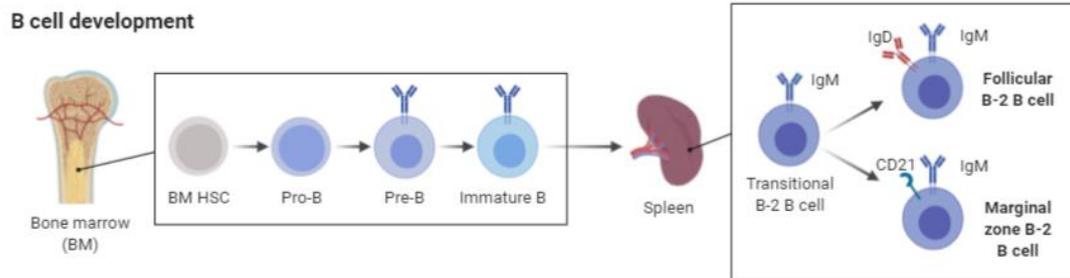
Por otro lado, la inmunidad celular se lleva a cabo por los linfocitos T, los cuales reconocen antígenos unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que se encuentran en células presentadoras de antígeno como células dendríticas y linfocitos B. Existen dos poblaciones distintas de linfocitos T, los cuales generan respuestas diferentes: los linfocitos T citotóxicos, que generan la muerte inmediata de una célula infectada, y los linfocitos T cooperadores que se encargan de liberar citocinas para la activación, proliferación y diferenciación de los distintos linajes leucocitarios y también promueven el aumento de la inflamación (Abbas, A; 2015).

## **Linfocitos B**

Las células de la línea linfoide (NK, T y B) se derivan de progenitores linfoides comunes, mismos que derivan de las células primordiales hematopoyéticas pluripotenciales que dan lugar a todas las células sanguíneas (Murphy, P; 2016).

La función primaria de los linfocitos B es la secreción de anticuerpos, por ello la diferenciación de estos se basa en el reordenamiento y expresión de genes que codifican para cadenas pesadas y ligeras del receptor de inmunoglobulina. Este reordenamiento se da por la recombinación de los genes V(D)J. Esto culmina con la expresión del receptor en la superficie celular del linfocito B, durante esta etapa, la cadena pesada reordenada se expresa en combinación con la cadena ligera sustituta. El reordenamiento de la cadena ligera es iniciado después de varios ciclos de división celular que portan el pre-BCR (Owen, J; 2014).

Durante el desarrollo de los linfocitos B existe una expresión diferencial de distintas moléculas, que generan señales que regulan todo este proceso, actualmente se ha descrito que este fenómeno puede estar dado por MicroRNAs (miRNAs) dado que estos influyen en la regulación post-transcripcional, este es uno de los muchos mecanismos involucrados en esta regulación (Figura 1) (Cofree y Koralov, 2017).



*Figura 1. Regulación del desarrollo de linfocitos B. El desarrollo de células B empieza con una célula madre hematopoyética y pasa por etapas de célula progenitora progresivamente más que llegan a la etapa de célula pro/pre B. En esta fase, la célula precursora comprometida de manera irreversible a la línea de células B y empieza la recombinación de los genes que codifican para BCR. Una vez que el BCR completa es expresada sobre la superficie celular, la célula inmadura, ahora una célula B transicional sale de la médula ósea para completar su maduración en el bazo (Biorender, 2020).*

Una de las moléculas con expresión diversa durante el desarrollo es CD38, ésta es una ectoenzima que también posee la actividad de receptor y está involucrada en distintos procesos. Se ha demostrado que en los linfocitos B provenientes de bazo de ratones recién nacidos, la expresión de la molécula CD38 aumenta conforme a su crecimiento, en este mismo estudio se midió la expresión de esta molécula en células de médula ósea de ratones adultos, siendo las células pro-B las que más expresaban (Donis, F, 2001). Este patrón diferencial de expresión también se observa en subpoblaciones de linfocitos B, en ratones, los linfocitos B transicionales 2 (T2) expresan mayor cantidad de CD38 que los linfocitos B transicionales 1 (T1), mientras que los linfocitos B maduros foliculares “naive” (FO), en el caso particular de los linfocitos B1 que residen en la cavidad peritoneal son los que presentan mayor cantidad de CD38 en su superficie (Vences-Catalán, F., & Santos-Argumedo, L.; 2011). Con todo esto se esperaría que la ausencia de CD38 tuviera un efecto negativo durante la linfopoyesis o hematopoyesis, pero en diversos estudios se ha demostrado que el ratón deficiente de la molécula no presenta problemas de ambos procesos.

### **Generalidades de CD38.**

La molécula CD38 esta codificada por el gen que lleva el mismo nombre en humano, se encuentra ubicado en el brazo corto de la región uno, banda 5 en las subbandas 3 y 2 (4p15.32) del cromosoma 4, mientras que en el ratón está en el cromosoma 5. Con respecto a la estructura esta se compone de 300

aminoácidos, cuenta con 16 alfa-hélices y 14 beta-plegadas y dos isoformas, tiene un peso aproximado de 42 kDa (UniProt Consortium, 2021).

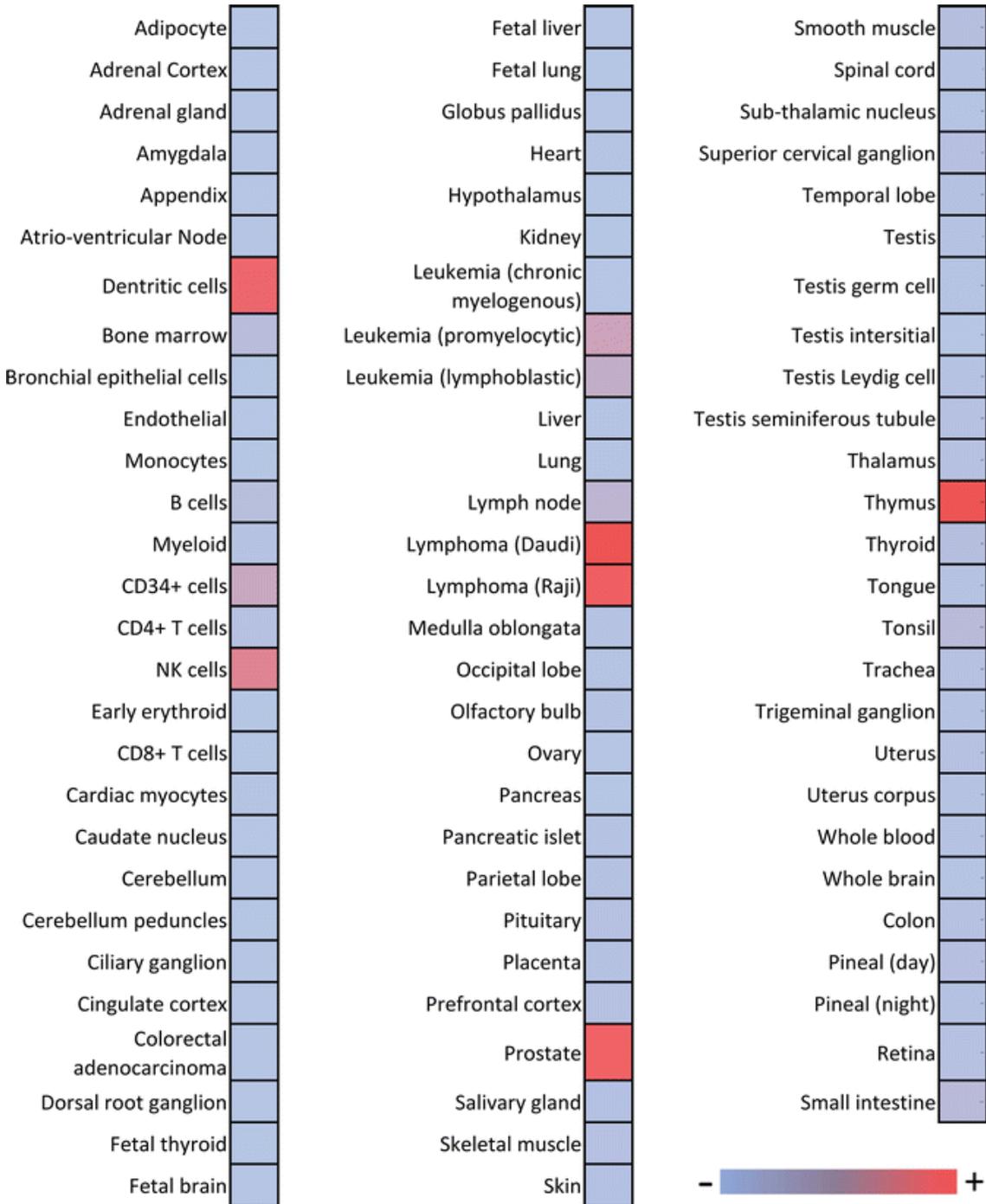


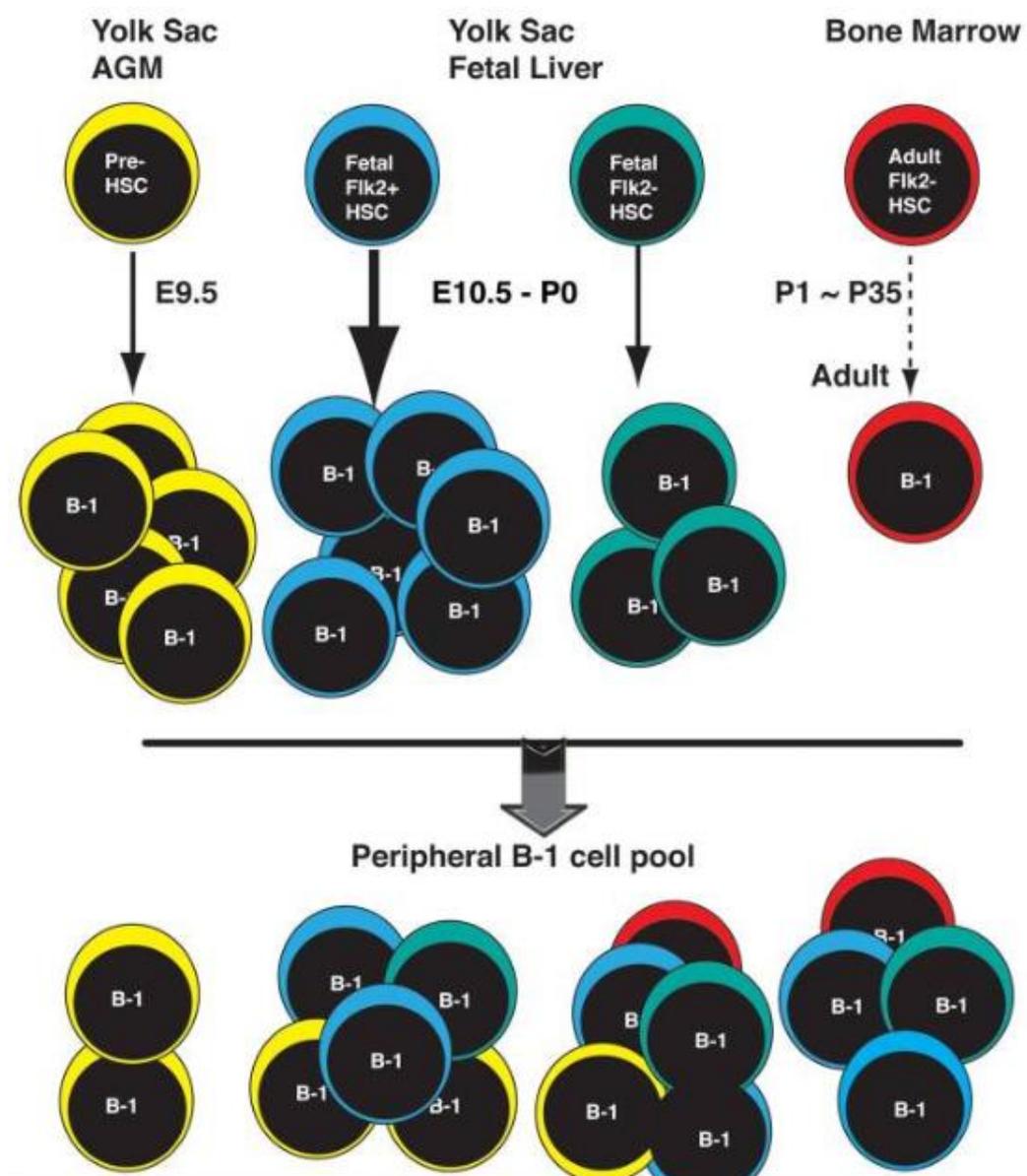
Figura 2. Mapa de calor que representa la expresión de mRNA de CD38 en tejidos humanos (Santos-Argumedeo L., 2012).

Es una proteína transmembranal tipo II que se encarga de sintetizar un segundo mensajero ADP-ribosa cíclico y nicotinato-adenina dinucleótido fosfato y en los linfocitos también funge como receptor (Vences-Catalán, F., & Santos-Argumedo, L.; 2011). La expresión del mRNA en humano es principalmente en cerebro, corteza, cerebelo, médula espinal, retina, corazón, arteria, hígado, músculo liso y esquelético, colon, tejido adiposo, riñón, páncreas, pulmón, faringe, tráquea, esófago, estómago, tiroides, saliva y glándulas suprarrenales, piel, próstata, testículos, ovario, vesícula, útero y placenta. A nivel celular es altamente expresado, en etapas tempranas como tardías, de la maduración de linfocitos B y T (Figura 2) (Santos-Argumedo L., 2012).

otro lado, CD38 como receptor celular de linfocitos tiene diferentes funciones tales como: proliferación celular, rescate e inducción de la apoptosis, fosforilación de proteína tirosina inducible, un aumento de bajo nivel en calcio intracelular y la expresión de varias moléculas de superficie, incluyendo MHC-II y CD69 (Moreno, M; Bojorques L; Zentella, A; 2005).

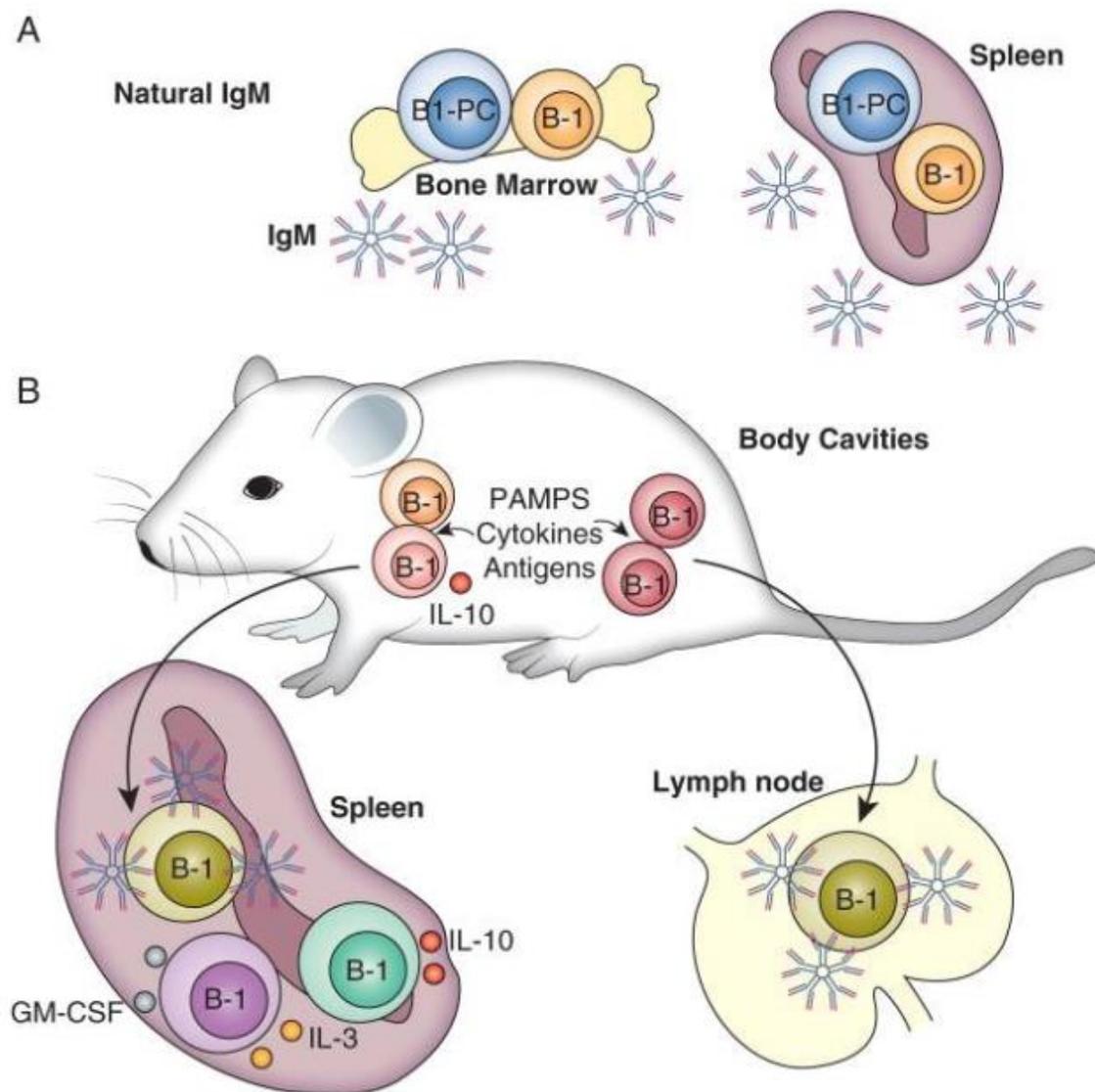
CD38 también ha sido estudiada en un grupo de linfocitos en ratón denominados B1, los cuales tienen su origen durante el desarrollo fetal ya que se encontraron enriquecidas en el saco vitelino, hígado fetal. Por otro lado, en el adulto se desarrollan en menor proporción en médula ósea (Figura 3) (Santos-Argumedo L., 2012; Hardy, R R y Hayakawa, K; 2015). Actualmente se ha descrito que uno de los factores involucrados en el desarrollo fetal de estas células es la regulación de Lin28b/Let-7, que tiene como principales funciones la regulación de diferentes vías metabólicas, proliferación y diferenciación (Zhou, Y., Li, Y. S., Bandi, S. R., Tang, L., Shinton, S. A., Hayakawa, K., & Hardy, R. R., 2015). Estas células se descubrieron por la expresión de la molécula CD5 (Kantor, AB, 1991). Aunque estas células se desarrollan durante la etapa fetal, Hardy y Yakanawa en 1991 descubrieron que estas permanecen en etapas adultas (Figura 3) (Baumgarth, N; 2017).

Estas células se encuentran en mayor proporción durante la etapa fetal, sin embargo, en la etapa adulta se encuentran en menor porcentaje. Es preciso describir que estas células presentan características de células con una respuesta innata, pero pertenecen a células de respuesta adaptativa. Hardy y col. describió también que estas células se encuentran del 1-2 % en bazo, en un 10 % en cavidad peritoneal y del 3-5 % en cavidad pleural, las funciones principales de



*Figura 3. Los linfocitos B1 tienen múltiples progenitores. Existen por lo menos 3 diferentes células madre progenitoras en saco vitelino e hígado y por lo menos una en medula ósea durante la etapa adulta (Baumgarth, N; 2017).*

han estas células son la secreción de anticuerpos naturales, secreción de citocinas principalmente IL-10, también son presentadoras de antígeno, y secretan anticuerpos autorreactivos con antígeno Thy-1 (Figura 4), (Baumgarth, N; 2017). Recientemente también se han involucrado con la protección materna a través de la leche, ya que se sugiere que mayor parte de la secreción de IgG3 maternos proviene de las células B1 (Koch, G; Reiner, G; et al; 2016).

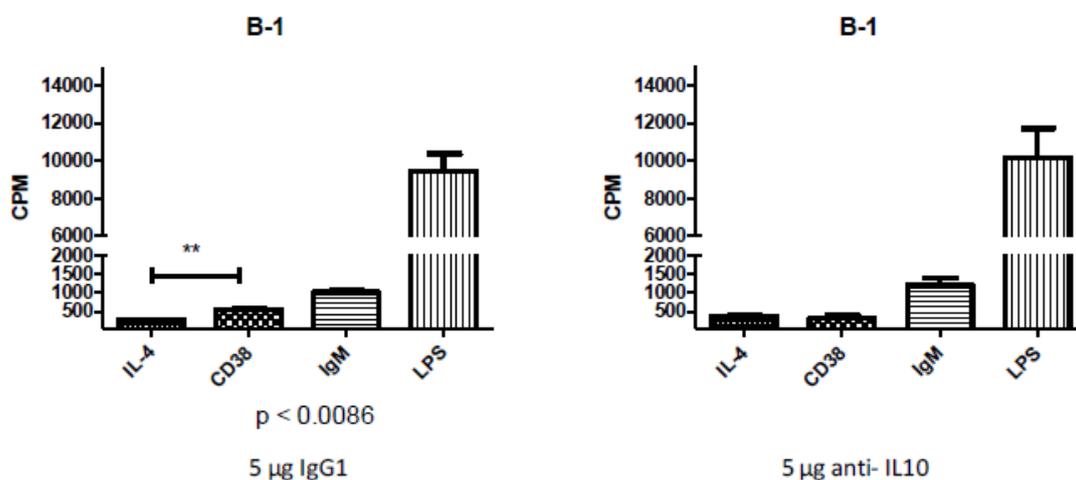


*Figura 4. Localización de linfocitos B1. Compartimentos de localización y órganos blanco las células B1 en ratón (Baumgarth, N; 2017).*

## ANTEDECENTES

En resultados obtenidos previamente por Trujillo en 2011 en su trabajo de Maestría. Se estimularon linfocitos B1 (purificados a partir de peritoneo) con un anticuerpo agonista para CD38 teniendo como controles IL-4,  $\alpha$ -IgM, LPS, se generaron dos grupos a partir de las células purificadas de peritoneo, en uno de ellos se colocó un control de isotipo (IgG1) junto con el estímulo anti-CD38 (Figura 5, izquierdo), en el otro grupo, el anticuerpo monoclonal anti-IL-10 nuevamente en aquellas células con el estímulo anti-CD38 (Figura 5, derecho). Como se puede observar, a pesar de adicionar el anticuerpo anti-IL-10 para

bloquear su actividad autocrina, los linfocitos B1 no proliferaron al estímulo con un anticuerpo  $\alpha$ -CD38, por ello se consideró que la cantidad de anticuerpo no fue suficiente para inhibir la función de esta citocina, es por ello que en este trabajo se propuso utilizar un anticuerpo contra el receptor de la misma, y con esto asegurar el bloqueo de la función de esta citocina.



**Figura 5. Proliferación de linfocitos B1.** Células estimuladas con IL-4, anti-CD38, anti-IgM y LPS en presencia de 5 µg de anti-IL-10 o IgG1 como control. Las células fueron incubadas por 72 horas a 37 °C. Proliferación expresada en CPM (cuentas por minuto) de timidina [ $^3$ H] (Trujillo, A; 2011).

El estudio de las moléculas que componen a una célula se realiza mediante diferentes técnicas y el uso de diferentes reactivos como es el caso de anticuerpos monoclonales para ello primero se debe definir que es un anticuerpo. Estos son secretados por las células plasmáticas en respuesta al reconocimiento de un agente ajeno al organismo por medio de receptores. (Owen, J; 2014, Rendón, M; 2008).

Los anticuerpos monoclonales fueron generados por primera vez mediante la generación de hibridomas, los cuales se forman a partir de la fusión de una célula de mieloma y de una célula productora de anticuerpos, en 1975 Köhler y Milstein publicaron este hallazgo. Hoy en día, los anticuerpos monoclonales se usan en una variedad de aplicaciones como son la citometría de flujo, la clasificación de células, en inmunoensayos, diagnósticos y para usos terapéuticos. Aunque los pasos para su producción suenan relativamente sencillos es un proceso que requiere de un buen manejo de la técnica. El primer paso es la inmunización de un organismo con el antígeno purificado, lo siguiente

es aislar y purificar las células mononucleares de bazo, para que se fusionen con células de mieloma genéticamente modificadas, posteriormente se crecen en un medio selectivo, después se clonan por dilución limitante y se hacen tamizajes para verificar la producción de anticuerpos (Hanack H; Martin, M. y Listek M; 2016). Para obtener grandes cantidades de anticuerpos, los hibridomas se crecen en biorreactores.

Una vez que se obtienen los anticuerpos estos deben de ser purificados, en el caso particular de esta tesis se realizó este proceso por cromatografía en columna de afinidad. La cromatografía se basa en la separación de moléculas de acuerdo a su composición química. Se compone de una fase estacionaria y una fase móvil, la primera de ellas sirve como un sistema de retraso por donde los analitos se irán desplazando a diferentes velocidades y tiempo que se denomina tiempo de retención, la fase móvil es solo la solución que contiene la muestra (Skoog, D; 2014).

La cromatografía por afinidad se basa en el uso de una columna de sefarosa (fase estacionaria) que contenga unida proteína G, A o una combinación de ambas, estas proteínas son extraídas de los géneros de bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus*, dado que, de manera normal estas bacterias las secretan para neutralizar anticuerpos, lo que permitirá la captura de los anticuerpos.

Las muestras que contienen los anticuerpos se colocan en un buffer de unión y se hacen pasar por la columna, seguido de múltiples lavados, posteriormente las muestras se eluiran con un buffer ácido para romper la interacción proteína-proteína y nuevamente neutralizadas para su posterior análisis y uso (Hage, D. y Matsuda, R; 2019).

Por otro lado, una tecnología que es de suma importancia mencionar es la citometría de flujo, la cual se basa en un análisis de células individuales o partículas que se hacen fluir a través de un canal, que será incidido por láseres y dependiendo de la composición de éstas y de la fluorescencia que emitan, desviarán la luz con una longitud de onda que es captada por una serie de filtros, esta información se convierte en datos que se registran en un equipo de cómputo, para que después sean analizados por programas específicos. La citometría de flujo es una herramienta poderosa que tiene aplicaciones en múltiples disciplinas como inmunología, virología, biología molecular, biología del cáncer y monitoreo de enfermedades infecciosas. Uno de los mayores usos

que se le ha dado a la citometría de flujo es la caracterización de los distintos tipos celulares por el uso de anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos a un sinfín de moléculas de superficie e intracelulares. En la actualidad existen citómetros de flujo acoplados a otras técnicas como microscopia confocal, espectrometría de masa y analizadores espectrales. (Mckinnon, K; 2018).

## **JUSTIFICACIÓN**

La molécula CD38 está involucrada en diferentes procesos de desarrollo y maduración de los linfocitos B, además tiene una alta expresión en los linfocitos B, también se ha descrito que la sobreproducción de IL-10 inhibe la proliferación de estas células ante diversos estímulos, lo cual sugiere que esta citocina genera una autorregulación de estas células. Por lo tanto, es importante conocer el papel que tiene el CD38 en la regulación de las células B1 por medio de la IL-10.

## **HIPÓTESIS**

CD38 autorregula la proliferación de las células B1 a través de la producción de IL-10.

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la participación de CD38 en la función de linfocitos B1 de ratón.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Purificar anticuerpo agonista de ligando de CD38 a partir de ascitis

Caracterizar la expresión de la molécula CD38 en diferentes poblaciones de linfocitos B en el bazo y la cavidad peritoneal.

Determinar la proliferación de los linfocitos B1 ante el estímulo de la molécula CD38.

Analizar la producción de la IL-10 de los linfocitos B1 ante el estímulo con CD38.

Determinar la proliferación de células B1 ante el estímulo de CD38 después del bloqueo del receptor de IL-10



## **METODOLOGÍA**

### **Purificación del anticuerpo monoclonal NIM-R5 (anti-CD38)**

Se purificó el anticuerpo NIM-R5, a partir de líquido ascítico obtenido de ratones atímicos inoculados previamente con el hibridoma productor, por cromatografía de afinidad, utilizando el equipo FPLC (AKTA™ UPC-900, Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) (cromatografía líquida rápida de proteínas) mediante una columna de proteína G (HiTrap Protein G HP 1 mL, GE healthcare). Se utilizó la columna de proteína G con un volumen final de 3 mL por corrida de purificación. Se pasó por la columna el líquido ascítico diluido en buffer de unión (fosfato de sodio y cloruro de sodio 0.15 M pH=7.2), 1/2, posteriormente se usó buffer de elución (Glicina 0.1 M pH= 2.3) para romper la unión del anticuerpo con la proteína G de la columna y se fueron recolectando fracciones de 500 µL que contenían 50 µL de buffer de neutralización (Fosfato o TRIS 1M pH= 8-9) por fracción. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry colectada en cada una de las fracciones. Se realizó una diálisis con PBS 1 X a las fracciones obtenidas cambiando cada 3 horas este buffer por nuevo. La pureza se caracterizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 15 %. Después este anticuerpo se esterilizó mediante un filtro de membrana con un poro de diámetro 0.20 µm separándolo en alícuotas de 1 mL.

Para verificar la funcionalidad de dicho anticuerpo se realizó una tinción de superficie para citometría de flujo. Para esta tinción se obtuvieron células mononucleares a partir de bazo de un ratón silvestre y otro deficiente de CD38, se colocaron un millón de células de cada bazo en tubos diferentes, a cada uno se añadió 6 µg de anticuerpo purificado NIM-R5 incubando por 30 minutos, después este tiempo las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, después se adiciono 30 µL (1/200) de anticuerpo secundario de cabra anti-rata acoplado a ficoeritrina (Biolegend) y se incubó 30 minutos seguido de una centrifugación por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante. Por último, se fijaron las células con 300 µL de paraformaldehído 1 %. Los datos se adquirieron en LSR Fortessa (BD Biosciences) ó Cytotflex (BECKMAN COULTER) y se analizaron en el programa Flowjo v 10.0 (Tree Star Inc., Ashland, OR)

## **Animales**

En este trabajo se emplearon ratones BALB/c de 8-10 semanas hembras proporcionadas por la UPEAL de CINVESTAV. Este trabajo se realizó con aprobación del comité de ética de manejo de animales de la UPEAL bajo del protocolo No. 145-15.

### **Obtención de células de peritoneo.**

Se les practicó eutanasia a los ratones por dislocación cervical, se colocaron decúbito dorsal y se realizó un corte de la piel abdominal para exponer el peritoneo. A continuación, se inyectaron 10 mL de medio de tinción (SM, ver anexo) frío en cavidad peritoneal cuidando de no afectar algún órgano, se dio un masaje vigoroso y se extrajo todo el líquido (SM) con la suspensión celular del peritoneo. El líquido extraído se colocó en tubos falcon de 15 mL para después centrifugarlo a 300 g por 5 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 2 mL de SM.

### **Obtención de células mononucleares a partir de bazo.**

Después de realizar el lavado peritoneal se les extrajo el bazo y se disgregó en PBS 1 X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4) en una malla metálica, posteriormente la suspensión celular se agregó en un tubo con Ficoll-hypaque™ PREMIUM sterile solution (GE Healthcare) a temperatura ambiente y se centrifugó a 300 g durante 30 minutos, obteniendo un gradiente de densidad, una vez hecho esto se tomó la capa de células mononucleares, se lavaron con PBS 1X y centrifugaron a 300 g por 5 minutos, finalmente se resuspendieron en 5 mL de PBS 1X. Todo este proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

### **Conteo y viabilidad celular**

Para el conteo y viabilidad de células de bazo y cavidad peritoneal, se realizó una dilución 1/10 de las células (previamente homogenizadas) con azul de tripano al 0.4 %, contando las células en una la cámara de Neubauer. Finalmente se contaron los 4 cuadrantes específicos de glóbulos blancos en un microscopio óptico con objetivo de 10 y 40X, se calculó el número de células por mL con la siguiente formula:

$$\left[ \left( \frac{\#total\ de\ células}{4} \right) (10)(10000) \right] = células/mL$$

## Tinción de superficie de células para citometría de flujo

Para la tinción de moléculas de superficie se utilizaron un millón de células de cavidad peritoneal suspendidas en 30  $\mu$ L aproximadamente de SM. Las células se tiñeron con los anticuerpos monoclonales enlistados en la tabla 1 (Biolegened).

*Tabla 1. Lista de Anticuerpos. Se enlistan los anticuerpos y su respectivo fluorocromo acoplado, usados para la caracterización de las subpoblaciones de células B.*

ANTICUERPO	FLUOROCROMO
anti-CD16/CD32	No acoplado
anti-CD19	violeta brillante 421
anti-B220	violeta brillante 421
anti-CD3	isotiocinato de fluoresceína
anti-CD23	ficoeritrina-cianina 7 o violeta brillante 510
anti-CD5	ficoeritirina
anti-CD38	aloficocianina
anti-CD11b	ficoeritrina-cianina 7

Las células se incubaron por 20 minutos con  $\leq 1 \mu$ g de anticuerpo anti-CD16/CD32 a 4° C con la finalidad de bloquear los receptores Fc, evitando así una unión inespecífica de los otros anticuerpos. Después se lavaron las células con 1 mL de SM y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se colocaron los demás anticuerpos y se incubaron nuevamente las células por 20 minutos en oscuridad a 4° C. Nuevamente se lavaron las células con medio SM y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante. Por último, se fijaron las células con 300  $\mu$ L de paraformaldehído 1 %. Se adquirieron 100 000 eventos por cada muestra en LSR Fortessa™ (BD Biosciences) ó Cytotflex (BECKMAN COULTER) y se analizaron en el programa Flowjo v 10.0 (Tree Star Inc., Ashland , OR).

## **Tinción intracelular para citometría de flujo**

Una vez realizada la tinción superficial después de la fijación se lavaron las células con 1 mL de Saponina 0.01 % en PBS 1 X salino y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g, este lavado se realizó 2 veces, se decantó el sobrenadante y se incubaron las células con anticuerpo  $\leq 1$   $\mu\text{g}$  anti-CD16/CD32 por 20 minutos a 4° C. Se lavaron las células con 1 mL de Saponina 0.01 % y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante, este lavado se realizó 2 veces. Posteriormente se incubaron las células el anticuerpo anti-IL-10 por 20 minutos a 4° C. Se lavaron las células con 1 mL de Saponina 0.01 % y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante, este lavado se realizó 2 veces. Por último, se fijaron las células con 300  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído 1 %. Los 100000 eventos se adquirieron en el citómetro BD LSRFortessa (BD Biosciences) ó Cytoflex LX N3-V5-B3-Y5-R3-12 (BECKMAN COULTER) y los datos se analizaron en el programa Flowjo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

## **Ensayo de proliferación con CFSE**

Los estímulos utilizados para las células de bazo y cavidad peritoneal fueron: anti-CD38 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (NIM-R5), anti-IgM (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; eBioscience), LPS (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-IL-10R (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; eBioscience) todos estos los estímulos se realizaron junto con IL-4 (1 ng/mL).

Después de la obtención y conteo de células de peritoneo se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante. Al total (8 000 000) de las células se les añadió 1 mL de CFSE (Invitrogen, 1  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron por 5 minutos a 37° C. Una vez terminada la incubación, se agregaron 4 mL de RPMI frío no suplementado, para detener la reacción y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en RPMI. A continuación, se colocaron un millón de células/pozo en placas de 48 pozos con cada uno de los estímulos previamente descritos y se incubaron durante 72 horas en oscuridad a 37° C. Terminado el periodo de incubación se colocaron en tubos de citometría estériles, se lavaron con 1 mL de SM y se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y después se decantó el sobrenadante. Por último, se realizó la tinción superficial previamente descrita.

## **Medición de IL-10**

Después de la obtención y conteo de células de bazo y peritoneo se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante. A continuación, se colocó un millón de células en placas de 48 pozos con cada uno de los estímulos previamente descritos, además se añadió Brefeldina A (BFA) y se incubaron durante 72 horas. Concluido el periodo de incubación se colocaron en tubos de citometría estériles se lavaron con 1 mL de SM, se centrifugaron por 5 minutos a 300 g y se decantó el sobrenadante. Por último, se realizó la tinción superficial e intracelular con los anticuerpos correspondientes.

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico y las gráficas de histogramas se realizaron usando el programa “Graph pad prism 9 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) ” usando una prueba de Wilcoxon de dos colas para muestras pareadas.

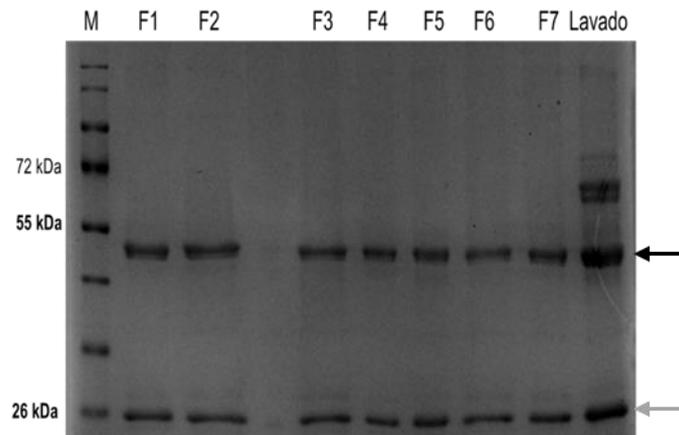
## RESULTADOS

### Cuantificación e integridad del anticuerpo monoclonal NIM-R5 purificado.

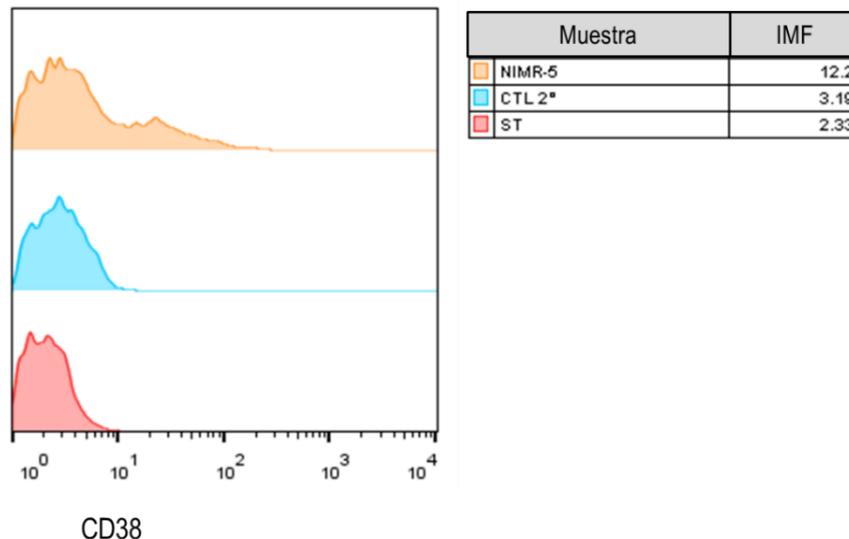
Para purificar el anticuerpo monoclonal anti-CD38 que se utilizó en este trabajo (NIM-R5), se realizó la técnica de cromatografía de afinidad, mediante una columna empacada con perlas de sefarosa unidas a proteína G. Se realizaron diferentes corridas de cromatografía. De las fracciones obtenidas, se midió la cantidad de proteína total (tabla 1) y las muestras se dializaron contra PBS. La medición se realizó antes y después de la diálisis. Para conocer la pureza e integridad del anticuerpo purificado, se hizo un gel SDS-PAGE al 12 % en condiciones reductoras, en la figura 6 se observa que en todas las fracciones purificadas del anticuerpo NIM-R5 se presentan dos bandas una en un peso aproximado de 50 kDa y otra de 25 kDa que corresponden a la cadena pesada y ligera respectivamente de una IgG (NIM-R5). También se colocó una muestra denominada “Lavado”, la cual se obtuvo después de que se pasó el líquido ascítico por la columna de afinidad, el cual contenía el material biológico que no se unió a la columna, para que sirviera como comparativo de las fracciones obtenidas.

*Tabla 2. Cuantificación de fracciones purificadas de anticuerpo monoclonal NIMR-5. La tabla indica en la columna derecha los miligramos totales correspondientes a cada fracción (columna izquierda).*

Muestra	mg totales
F1	0.3
F2	1.3
F3	2.5
F4	2.9
F5	2
F6	2.4
F7	2.7



**Figura 6. Integridad y pureza de anticuerpo agonista anti-CD38 (NIMR-5).** SDS-PAGE de las fracciones purificadas enumeradas F1-F7, la M indica el marcador, las flechas negra y gris indican las cadenas pesada y ligera respectivamente; por otro lado se colocó la muestra no unida a la columna de afinidad teniendo una comparativa para el grado de pureza del anticuerpo NMR-5



**Figura 7. Reconocimiento inespecífico de CD38.** Se realizó una tinción de células mononucleares obtenidas de bazo de ratones C57BL6, se agregó el anticuerpo NIM-R5 purificado después se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG- PE rata dilución 1/300 (gráfico naranja), como controles células solo con anticuerpo secundario y sin teñir (azul y rojo respectivamente).

Después de corroborar la integridad y pureza del anticuerpo, se procedió a comprobar si el anticuerpo NIMR-5 teñía a las células provenientes de bazo de ratón que expresan a la molécula CD38, para ello se realizó una tinción de citometría de flujo. Como se observa en la figura 7 una cantidad de células emiten una fluorescencia mayor a los controles mostradas en color anaranjado indicando que el anticuerpo NIM-R5 reconoció a la molécula CD38 en las células. Una vez confirmada la caracterización del anticuerpo, se esterilizó y se almacenó para posteriores ensayos.

### **Caracterización de las subpoblaciones de células B en bazo.**

La caracterización de linfocitos B en bazo, con los paneles de anticuerpos seleccionados, mostraron que existen dos poblaciones denominadas B1 y B2, por la expresión de  $CD23^-CD5^+$  y  $CD23^+CD5^-$  respectivamente, además las B2 se encuentran en mayor proporción que los B1, también se observó que en el histograma que correspondía a los linfocitos B1 la expresión de CD38 medida como IMF fue mayor. Estos datos fueron semejantes utilizando un anticuerpo anti-B220 y anti-CD19 (figura 8).

### **Caracterización de las subpoblaciones de células B de la cavidad peritoneal.**

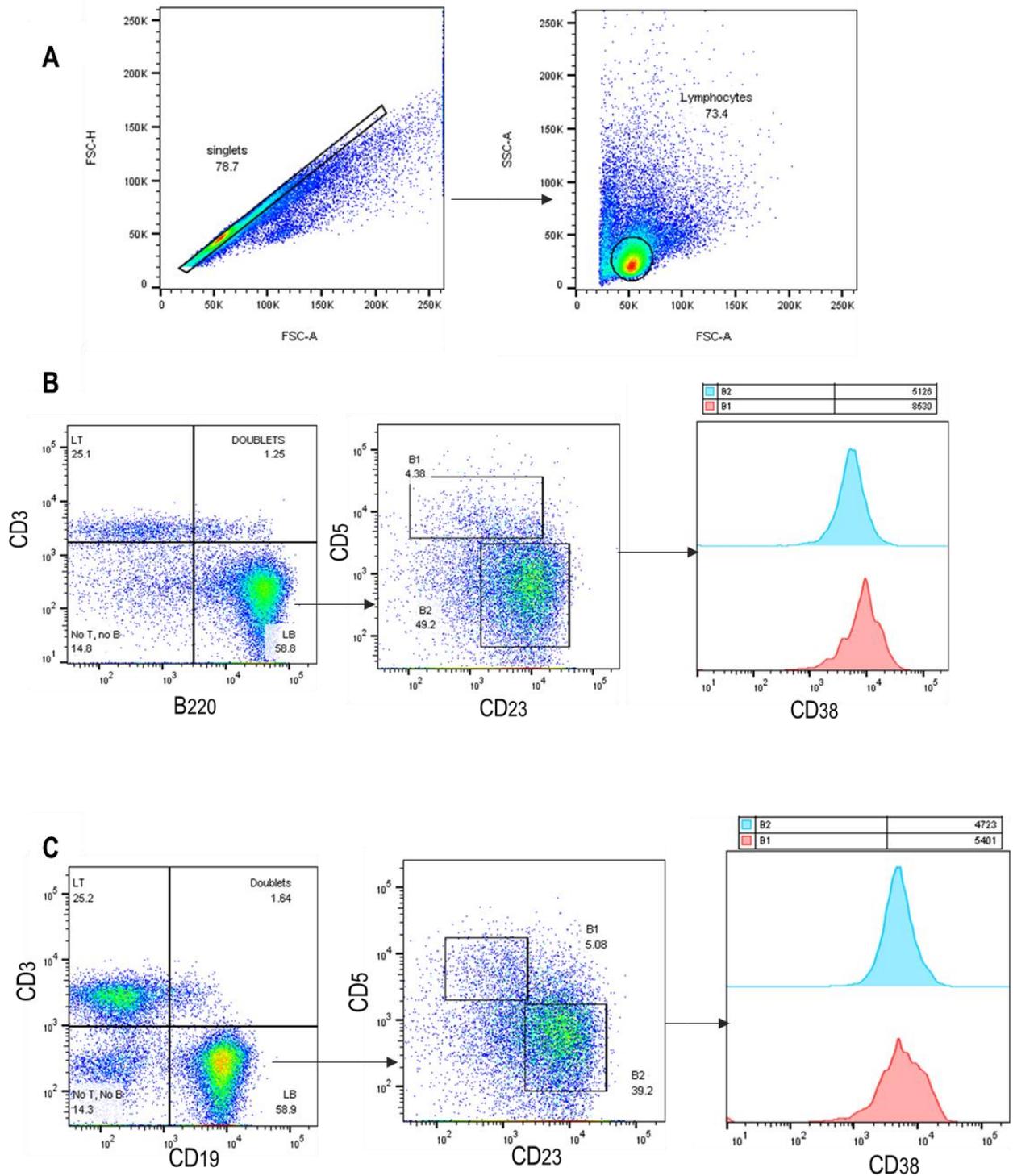
En la cavidad peritoneal se utilizaron los mismos paneles de anticuerpos para caracterizar las diferentes subpoblaciones de linfocitos B, en este caso se definieron tres subpoblaciones diferentes: B1b ( $CD23^-CD5^-$ ), B1a ( $CD23^-CD5^+$ ) y B2 ( $CD23^+CD5^-$ ), al medir la expresión de CD38 en cada una de ellas se observó que los linfocitos denominados B1a tenían la mayor expresión con respecto a las otras poblaciones (figura 9).

Por otro lado, se realizó un análisis estadístico de estos datos en el programa Graph pad 7, utilizando una prueba de Wilcoxon de dos colas para muestras pareadas. Al analizar el número de células absolutas en cavidad peritoneal caracterizadas con B220 o CD19 se tiene que las de mayor abundancia son las células B1a 3 veces más con respecto a las otras dos subpoblaciones (figura 10A); al momento de comparar los porcentajes de dichas células no se obtuvo una diferencia significativa (figura 10B); y lo mismo al comparar los números totales de linfocitos B1 y B2 (figura 10C).

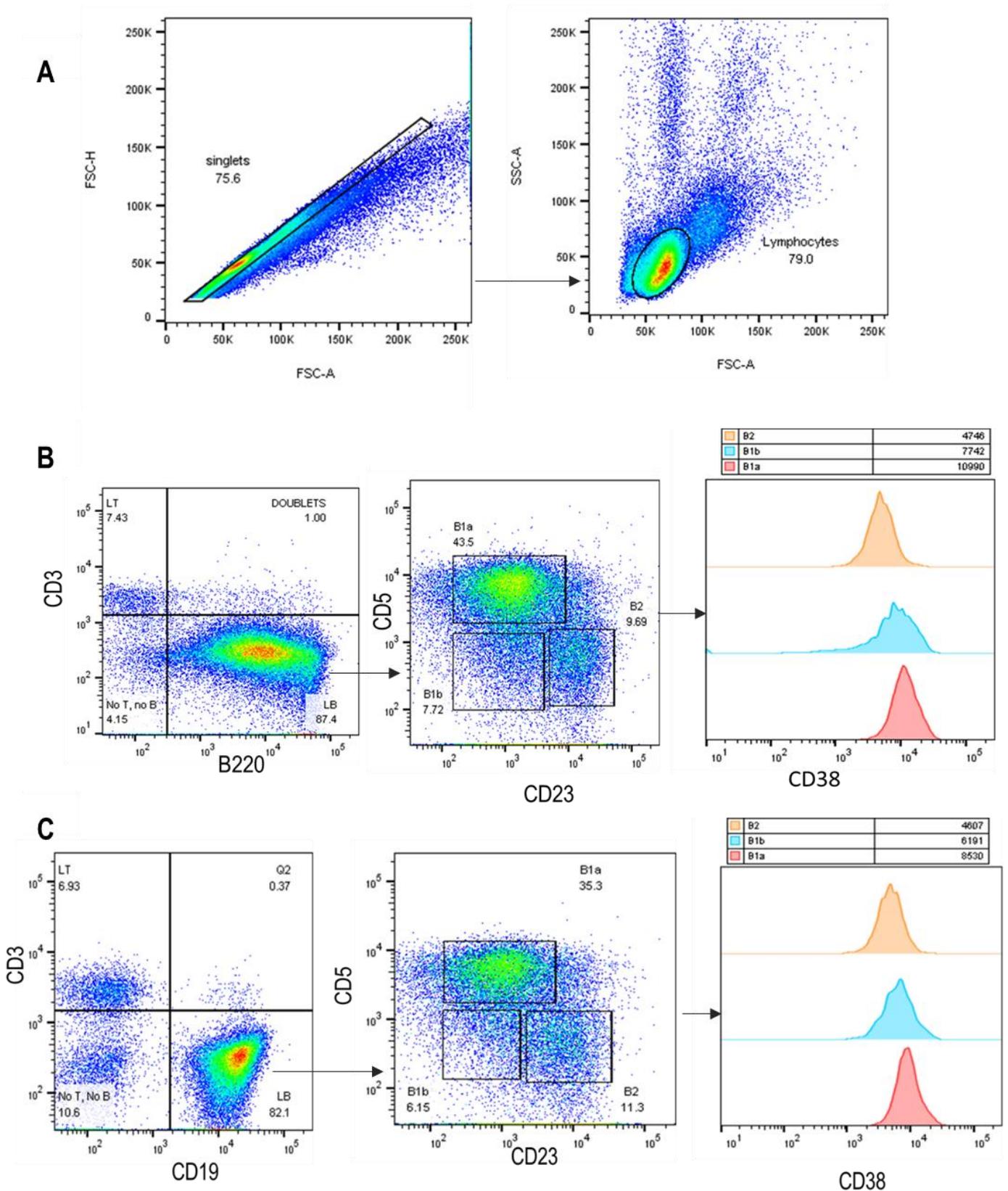
### **Expresión de CD19 y B220 en las subpoblaciones de células B en cavidad peritoneal**

Se hizo un análisis comparativo entre la expresión de CD19 y B220 en las subpoblaciones de linfocitos B caracterizados como se puede observar en la figura 10 cuando se observa que hay una mayor cantidad de células B1a que expresan B220 que CD19 reflejado en números absolutos y porcentajes. Sin

embargo, cuando se observa la figura 11A nos podemos percatar que estas células expresan una mayor cantidad de CD19 en superficie por célula. No así

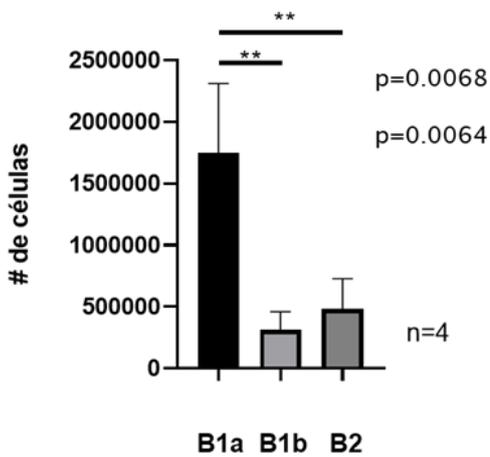


**Figura 8. Caracterización de la expresión de CD38 en linfocitos B de Bazo.** Se obtuvieron MN a partir de bazo de ratones hembra Balb/c silvestres de 8 semanas, la figura muestra las gráficas "dot plot" para la selección eventos: A. sencillos y posteriormente por tamaño y granularidad. B. Se tiñeron las células con anti-B220, anti-CD3, anti-CD23. Anti-CD5 y anti-CD38 y se midió la expresión de CD38 en las dos estirpes B220<sup>+</sup>. C. Se tiñeron las células con anti-B220, anti-CD3, anti-CD23. Anti-CD5 y anti-CD38 nuevamente se midió la expresión de CD38 esta vez en linfocitos CD19<sup>+</sup>.

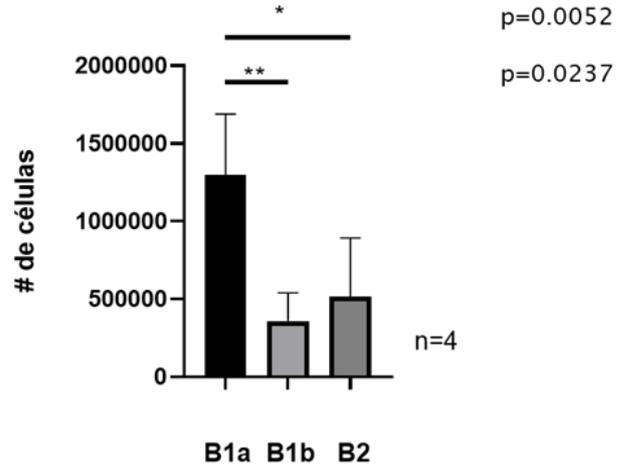


**Figura 9. Caracterización de las subpoblaciones linfocitos B en cavidad peritoneal.** Se obtuvieron células a partir de un lavado peritoneal de ratones hembra Balb/c silvestres de 8 semanas, la imagen muestra A. los "dot plot" para la selección eventos sencillos y posteriormente por tamaño y granularidad. B. Se tiñeron las células con anti-B220, anti-CD3, anti-CD23. Anti-CD5 y anti-CD38 y se midió la expresión de CD38 en las las tres diferentes subpoblaciones B220<sup>+</sup>. C. Se tiñeron las células con anti-B220, anti-CD3, anti-CD23. Anti-CD5 y anti-CD38 nuevamente se midió la expresión de CD38 esta vez en las tres diferentes subpoblaciones CD19<sup>+</sup>.

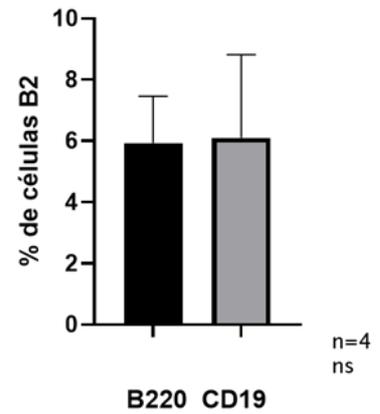
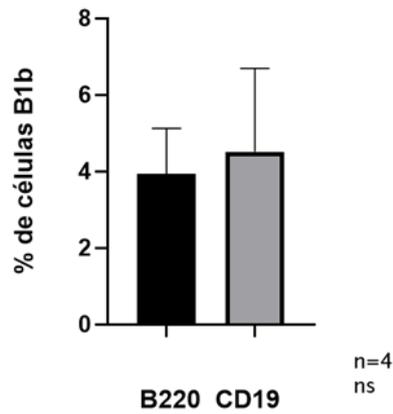
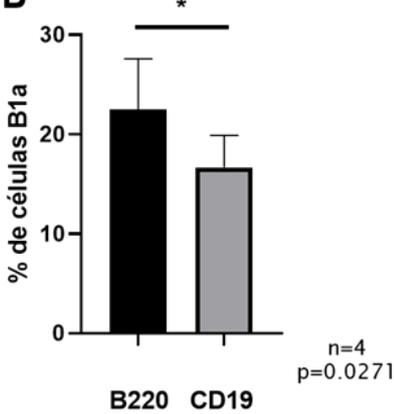
**A**  
# de células en cavidad peritoneal (B220)



# de células en cavidad peritoneal (CD19)



**B**



**C**

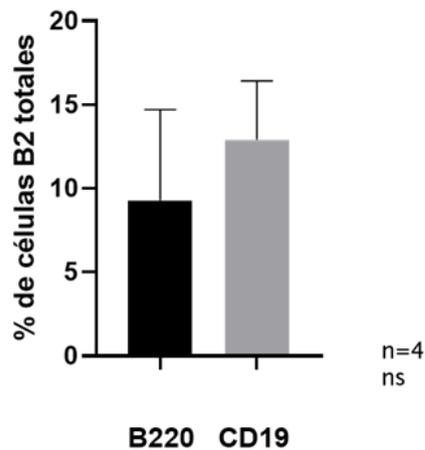
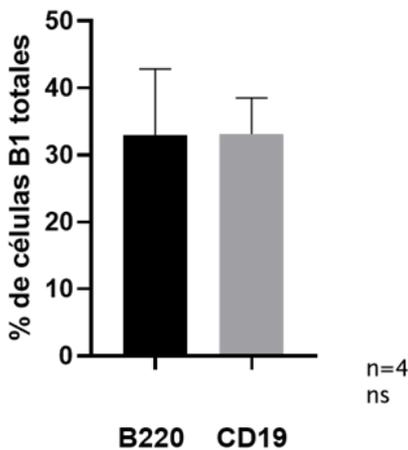


Figura 10. Porcentaje y total de células en cavidad peritoneal. Se realizó un análisis en el programa Graph pad 9 utilizando una prueba de wilcoxon de dos colas para muestras pareadas. A. Cantidad de linfocitos B de cada subpoblación de cavidad peritoneal. B. Porcentaje de cada subpoblación de linfocitos B de cavidad peritoneal. C. Porcentaje de linfocitos B1 y B2 totales de cavidad peritoneal.

para las células B1b. Por otro lado, aunque en las células B2 y no existe diferencia entre las células que expresan estos receptores (figura 10A y 10B), si hay una diferencia en la expresión, pero en este caso en B220 (figura 11C).

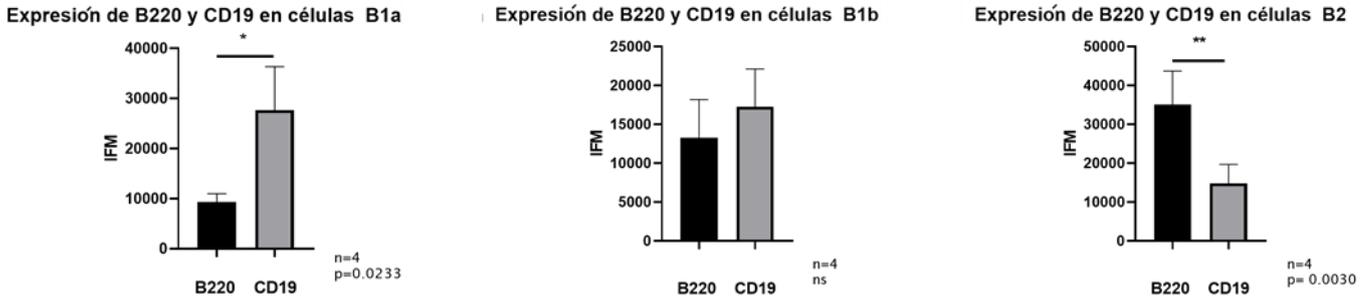


Figura 11.. Expresión de CD19 y B220 en cada subpoblación de linfocitos B de cavidad peritoneal. Se realizó un análisis de expresión de marcadores de linfocitos B CD19<sup>+</sup> o B220<sup>+</sup> a cada subpoblación de linfocitos B caracterizados en cavidad peritoneal. Se realizó una prueba de Wilcoxon de dos colas para muestras pareadas; p= 0.0233 y 0.0030.

### Expresión de CD38 en linfocitos B de cavidad peritoneal.

A partir de los analizado en la figura 9 se comparó la expresión de CD38 en cada subpoblación mediante IMF, donde se observa una diferencia significativa en la expresión de esta molécula. Determinando así que, la subpoblación con mayor expresión son los linfocitos B1a con respecto a los otras dos (Figura 12).

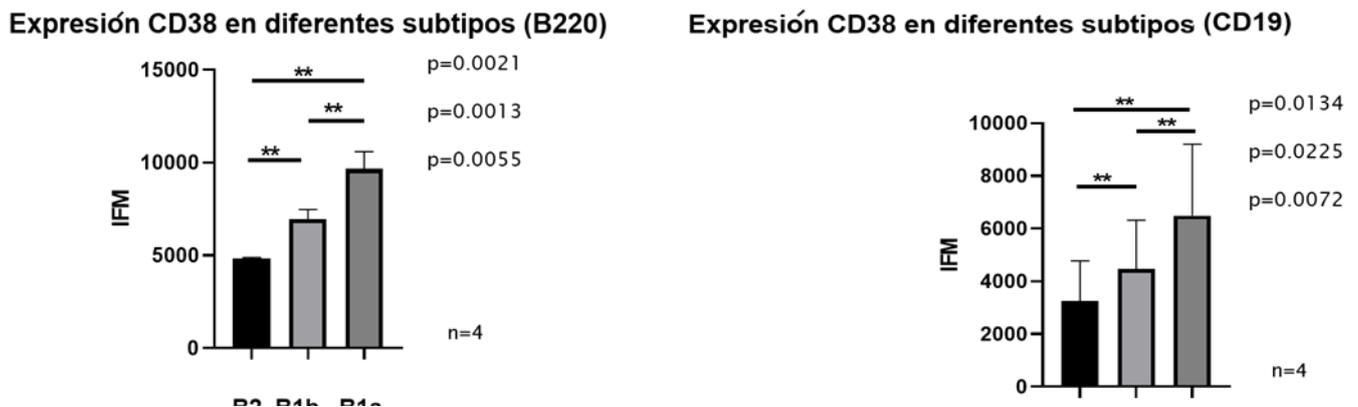
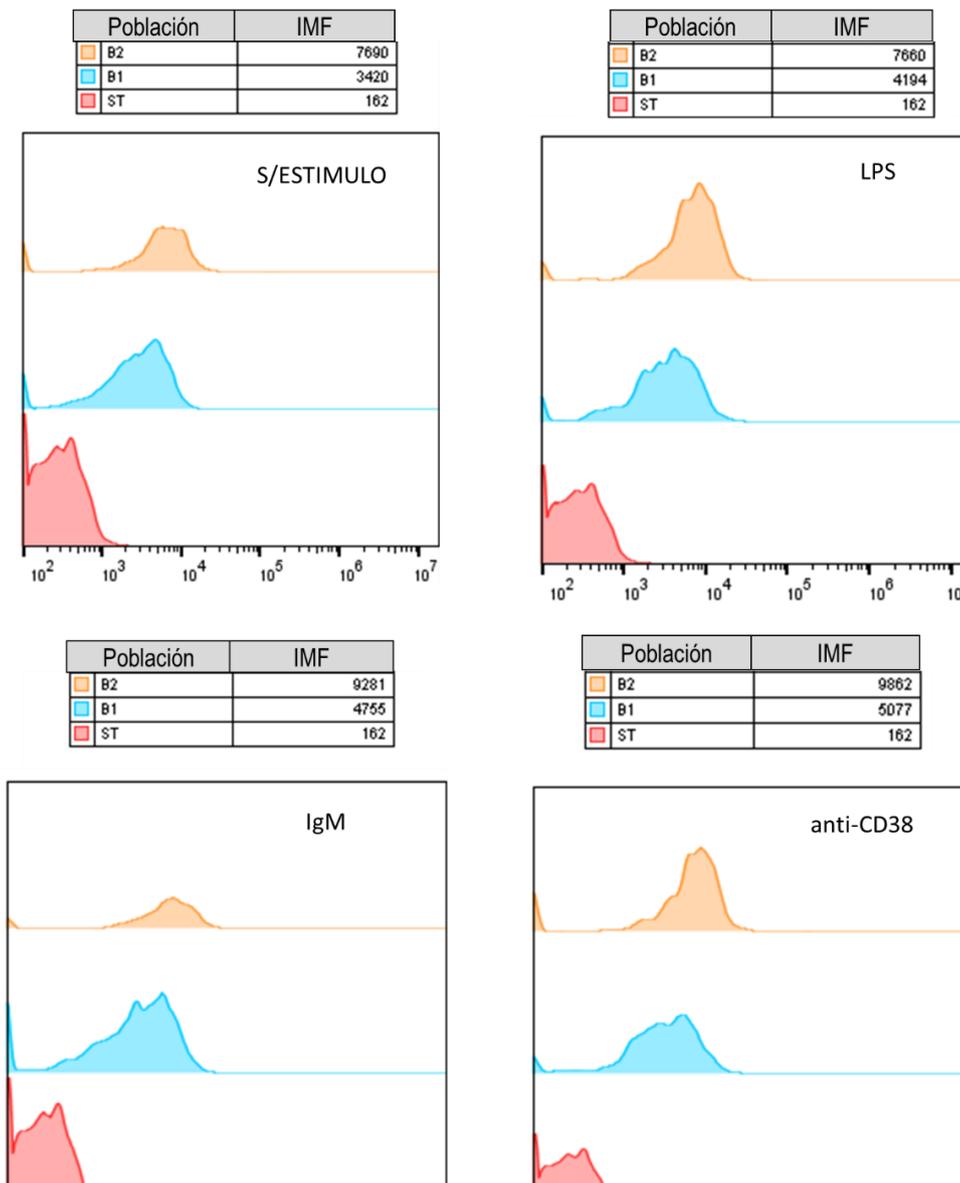


Figura 12. Expresión de CD 38 en subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal. Se analizó la expresión de CD38 en linfocitos B de cavidad peritoneal y se comparó caracterizándolos con dos marcadores diferentes propios de linfocitos B. Se realizó prueba de Wilcoxon de dos colas para muestras pareadas.

## Expresión de IL-10 en linfocitos B de cavidad peritoneal.

Se midió la expresión intracelular de IL-10 en subpoblaciones de linfocitos B ante los tres estímulos y se encontró que con CD38 había un ligero aumento en la expresión de IL-10 en linfocitos B1, esto determinado por la intensidad media de fluorescencia. Es preciso mencionar que esta tendencia en la expresión diferencial se mantuvo ante todos los estímulos (Figura 13).

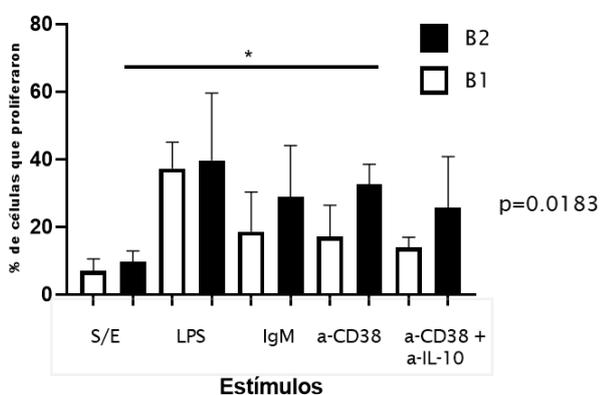


**Figura 13.** Expresión de IL-10 intracelular de las subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal ante diversos estímulos. Las células totales de cavidad peritoneal fueron incubadas en presencia de LPS, anti-IgM y anti-CD38 en presencia de BFA en placas de 48 pozos por 72 horas a 37° C. LA expresión de IL-10 se midió por citometría de flujo.

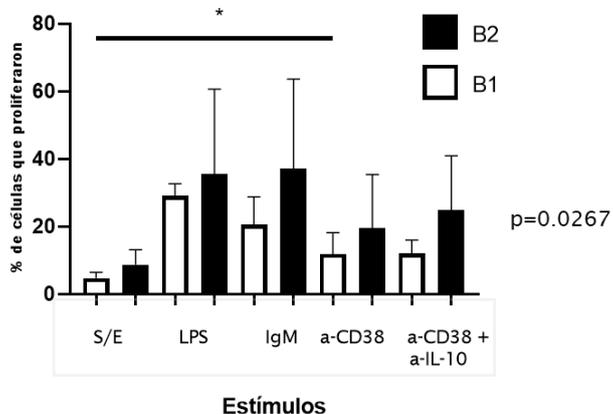
## Proliferación de las tres subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal.

Se realizaron ensayos de proliferación, de las células de cavidad peritoneal previamente teñidas con CFSE, ante diferentes estímulos por 48 y 72 horas. En el análisis de las muestras, se obtuvieron los valores del porcentaje de células B1 (CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup> y CD5<sup>+</sup>) y B2 (CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> y CD5<sup>-</sup>) que proliferaron. Se observó que, ante el estímulo con el anticuerpo anti-CD38 no existe una diferencia significativa en la proliferación de los linfocitos B1 con respecto a los no estimulados, y comparando entre el estímulo de sólo anti-CD38 con el que además se le adicionó el anticuerpo anti-receptor de IL10 no se observa tampoco diferencia a las diferentes horas analizadas (Figura 14).

proliferación células de peritoneo (48 hrs)



proliferación células de peritoneo (72 hrs)



**Figura 14. Proliferación de subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal.** Para el ensayo las células de peritoneo se teñeron con CFSE previo a los estímulos con LPS, anti-IgM, anti-CD38 y CD38+anti-IL-10R. La gráfica muestra el porcentaje de las células que proliferaron a las 48 y 72 horas después de estímulo.

## DISCUSIÓN

Para el desarrollo de esta tesis primero se purificó el anticuerpo NIM-R5, mediante la técnica de FPLC con el acoplamiento de una columna de afinidad la cual permite la unión del anticuerpo a la proteína G, ésta es una proteína que se extrae de *Streptococcus spp* y la cual se une a la parte fc del anticuerpo (Nezlin, R; Ghetie, V; 2004 y Hermanson, G; 2013). Al igual que todas las cromatografías, esta se compone de una fase estacionaria y una fase móvil, en este caso la fase sólida de la columna se acopló a un equipo de FPLC, el cual permitió una purificación más rápida, esta es una técnica que se basa en la separación de alta resolución de moléculas principalmente proteínas proporcionando las condiciones adecuadas de presión, pH y flujo (Madadlou, A., O'Sullivan, S., & Sheehan, D., 2004).

Uno de los factores importantes a considerar para producir la mayor cantidad de anticuerpo fue la muestra de donde se obtuvo, por ello este fue purificado a partir de ascitis de donde es posible obtener una mayor cantidad de anticuerpos en comparación con el recuperado de sobrenadante de cultivo (Neoh, S; Gordon, C; Potter, A y Heddy Z; 1986). Por otro lado, las cantidades obtenidas de este anticuerpo son comparables con las evidenciadas en la literatura (Lim, S; Manus, H; Gooley, A; Williams, K y Rylatt, D; 1998). Dentro de la caracterización del anticuerpo purificado se realizó una SDS-PAGE la cual mostró una alta pureza e integridad del anticuerpo monoclonal, ya que al comparar la muestra del “lavado” (que es la solución que eluyó por la columna y que no se unió a ella) se observa que aún contenía proteínas “contaminantes”, mientras que los anticuerpos purificados ya solo presentan bandas características de las cadenas pesada y ligera de IgG (Abbas, A; 2005). La finalidad de esta purificación fue que el anticuerpo se utilizaría en los ensayos de estimulación posteriores, ya que este anticuerpo es agonista, es decir mimetiza lo que hace el ligando de CD38. Por ello el ensayo de funcionalidad del anticuerpo era muy importante donde se demostró que si podía reconocer las células que presentaban este marcador en el bazo, como se muestra en la figura 7.

La descripción de las células B1 por primera vez fue en 1980, durante el paso de los años se han caracterizado con diferentes marcadores como CD19, B220, CD43, CD11b, IgM, IgD y CD5, (Berland, R., & Wortis, H; 2002). Primordialmente el descubrimiento de los linfocitos B1 fue por su expresión de CD5, denominadas por consenso como células B CD5<sup>+</sup> con el paso del tiempo se

descubre que existen otras células con características similares, pero con baja o nula expresión de CD5, por ello se generó una nueva nomenclatura llamándolas B1a (CD5<sup>+</sup>) y B1b (CD5<sup>-</sup>), (Stall, A. M., Adams, S., Herzenberg, I. A., y Kantor, A. B; 1992; Berland, R., & Wortis, H; 2002). CD5 es una molécula descrita inicialmente como marcador de superficie de linfocitos T implicado en su supervivencia y modulación de la señal de TCR, en el caso de linfocitos B se vincula a la asociación con el BCR provocando fosforilación y de este modo generar una regulación negativa, además también se ha mencionado que la presencia de este inhibe la traslocación de Nf- $\kappa$ B (Burgueño, E; Mier-Aguilar, C; Soldevila, G,2018; Lankester AC, van Schijndel GM, Cordell JL; et al;1994).

Aunque los precursores de estas células se generan durante la etapa fetal, estos se derivan en menor cantidad en médula ósea en la etapa neonatal y desaparecen en etapas adultas, por lo que la presencia de estos linfocitos en el adulto se debe a que son autorrenovables (Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E,2007; Hardy, R y Hayakawa, K; 2015).

La caracterización de los linfocitos B en cavidad peritoneal se basó en lo realizado por Trujillo en 2011, la subpoblación que se encontró con mayor abundancia fueron los linfocitos B1a, se ha descrito que estas células tienen una mayor capacidad respuesta a procesos inflamatorios (Rauch, P; Chudnovskiy A, Robbins CS,et al 2012; Weber Weber GF, Chousterman BG, Hilgendorf I,2014 y Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L., & Wang, P., 2015).

Durante el estudio y caracterización de linfocitos B se han utilizado diversas moléculas de superficie para discriminar a estos de otras células entre ellas CD19 el cual es una glicoproteína transmembrana transductora de señales que se asocia con CD21 y CD81 inducen señales de activación como lo es la liberación de calcio (Reth, M; Nitschke, L; Hikida, M y Kurosaki, T., 2015). Por otra parte, B220 o CD45R es una fosfatasa que regula positivamente la señalización del BCR (Penninger, J; Irie, J; Sasaki, T. y Oliveria-dos-Santos, A., 2001), en el caso de este último se cataloga como un marcador que se expresa en todas las células B del ratón, sin embargo, en humanos solo se expresa en un subconjunto de células B de memoria que no expresan CD27 (Rodig, S. J., Shahsafaei, A., Li, B., & Dorfman, D. M., 2005). Además, se ha descrito que B220 se puede expresar en subpoblaciones de células dendríticas (□ Nikolic, T., Dingjan, G. M., Leenen, P. J., & Hendriks, R. W., 2002).

Por lo antes mencionado durante este trabajo se realizó un análisis comparativo entre la expresión diferencial de B220 y CD19 en las diferentes subpoblaciones de estos linfocitos con el fin de ver si dependiendo de la presencia de una u otra de estas moléculas modificaba las proporciones y números totales de las subpoblaciones de LB, se encontró que solo existía una diferencia significativa en linfocitos B1a tanto en números absolutos como en porcentajes, no así para las otras subpoblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal. Al comparar el nivel de expresión de estas moléculas en cada subpoblación se observó que los linfocitos B1a presentan una expresión de hasta dos veces más de CD19 que de B220, mientras que los linfocitos B2 se observó todo lo contrario. Durante el desarrollo fetal los linfocitos B carecen de la expresión de B220, pero no así de CD19 (Montecino, Rodriguez, Leathers H, Dorshkind K; 2006). Aunque en este punto es preciso mencionar que estas células B1 han sido definidas como bajas o nulas en la expresión de B220, los datos aquí mostrados se observan que tienen una expresión diferencial de esta molécula, por lo que nos lleva a sugerir que estas células pudieran tener un factor que induce la expresión de esta B220 en etapas adultas.

Las células B1 tienen la capacidad secretar IL-10 la cual es una citocina reguladora principalmente relacionadas con el control y la inhibición de respuestas inflamatorias por parte de otras células y la homeostasis de la mucosa intestinal (Shouval, S; Ouahed, J; Biswas, A; y colaboradores, 2014). Aunque esta citocina se ha implicado a la proliferación de los linfocitos B1, en un estudio realizado Sindhava y colaboradores han demostrado que la presencia de esta interleucina inhibe la proliferación de las células B1 en respuesta a diferentes ligandos de TLRs 2, 3, 4, 5, 7 y 9, por ello, proponen que la neutralización de la respuesta de IL-10 inhibirá estos efectos, provocando la proliferación de estas células y efectivamente lo demuestran bloqueado el receptor de IL-10 (Sindhava, V; Woodman, M; Stevenson, B; 2010).

Datos obtenidos por Trujillo A. (TESIS DE MAESTRIA) en cuyo caso se encontró que el estímulo de CD38 no promueve la proliferación de las células B1. Cuando trataron de verificar que la ausencia de proliferación ante el estímulo de CD38 en los linfocitos B1 se debía a que estos secretan IL-10, por lo tanto, al inhibir esta citocina se esperaba que estas células ahora si pudieran proliferar, pero no se pudo observar, se sugirió que la utilización de un anticuerpo neutralizante de IL-10 y no del receptor probablemente no bloqueó totalmente la interacción con

los receptores y por tanto siguió actuando sobre las células. Por ello en este trabajo se propuso utilizar un anticuerpo anti-IL-10R, donde los datos muestran que las células B1 no tienen una diferencia en la proliferación ante el estímulo con CD38 y CD38 + anti-IL10R.

Primero se corroboró que el estímulo de CD38 inducía la producción de IL-10 en estas células, como se puede apreciar en la Figura 13, tanto en las células B1 como las B2 producen IL-10, en donde, las células B2 tienden a expresar una mayor cantidad en comparación con las células B1, ante el mismo estímulo. También este comportamiento de producción de IL-10 se aprecia con los otros estímulos, por lo que este resultado contrasta con los datos previamente reportados por Sindhava et al, 2010, donde observan un comportamiento contrario, es decir, con los estímulos de LPS se aprecia una mayor producción de IL-10 en las células B1 que en las B2. Cabe mencionar que los experimentos no se realizaron bajo las mismas condiciones, ya que en nuestro caso las células no estaban purificadas por tanto existió una influencia de macrófagos en el medio o moléculas secretadas por estos mismos que modificarán la producción de la interleucina y además la medición en este trabajo se realizó por citometría y ellos por ELISA.

Ya que se observó que las células B1 producían IL10, la pregunta que se quería responder después fue si estas células proliferaban ante el estímulo de CD38 y si esta proliferación aumentaba al agregar un anticuerpo contra el receptor de IL-10. Al analizar la proliferación de las células B1 peritoneales después de los diferentes estímulos, se observó que, al incubar con el anticuerpo agonista de CD38 (NIMR5), las células B1 proliferaron poco a las 48 y a las 72 h, pero este efecto no se revirtió, cuando se utilizó un anticuerpo ant-IL-10R (figura 14). Este dato no es totalmente concluyente debido a que en los ensayos que se realizaron pudieron intervenir diferentes factores que evitaron observar un resultado claro, por ejemplo, no se logró hacer la separación de las diferentes poblaciones de la cavidad peritoneal, y con esto el método de cuantificación de proliferación utilizado puede estar afectado por la mezcla de las otras poblaciones celulares que están en el compartimento, y también probablemente influyó en el análisis general de los datos, como el no poder separar las células B1a y B1b mediante el marcador CD5 después de la proliferación. Otros autores logran tener datos más claros con poblaciones purificadas previamente (Sindhava, V; Woodman, M; Stevenson, B; 2010).

Se ha descrito que IL-10 ejerce una actividad autocrina y que señala por las vías JAK-STAT, principalmente STAT 3 en linfocitos B, sin embargo, en células T se ha demostrado que en linfocitos T-CD4<sup>+</sup> y macrófagos induce una inhibición de Nf-κB, mientras que en linfocitos TCD8<sup>+</sup> activa AP-1 y Nf-κB promoviendo proliferación, diferenciación y actividad citotóxica (Moore, K; Waal, R; Coffman, R; y Garra, A; 2001; Walter, M; 2014). Por otro lado, CD38 induce la activación de Nf-κB mediante la vía Btk/PC-PCL, PLD/PKC/NfκB independiente de PLC-γ2, además su actividad induce la liberación de calcio importante para la activación celular, además en modelos de cáncer se ha propuesto que CD38 podría tener una actividad de inhibición hacia p53, promoviendo la proliferación exacerbada (Moreno, E; López, L; Zentella, A; Humphries, L; Rawlings, D, y Santos-Argumedo L., 2005; Ge, Y; Long, Y; Xiao, S; Liang, L; He, Z; Yue, C; Wei, X; & Zhou, Y; 2019).

Anteriormente ya se ha descrito que la función de CD38 depende del estado de maduración del linfocito B que lo expresa, en células maduras promueve la proliferación y activación (Moreno, E; López, L; Zentella, A; Humphries, L; Rawlings, D, y Santos-Argumedo L., 2005) mientras que en células inmaduras participa en la apoptosis de las mismas (Romero-Ramírez, H., Morales-Guadarrama, M. T., Pelayo, R., López-Santiago, R., & Santos-Argumedo, L., 2015). Todas las poblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal expresan CD38, siendo la de mayor expresión los linfocitos B1a, la alta expresión de CD38 sugiere una función importante en estas células; después de estimular la molécula se promueve la producción de IL-10 y dado que esta interleucina tiene diversas funciones puede tener efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos bajo distintas circunstancias. Estas células consideradas células B reguladoras, se les han conferido un papel importante en el control de células autoreactivas y por lo tanto su participación en la fisiopatogenia de varias enfermedades autoinmunes es crucial. Recientemente se ha descrito que ratones deficientes de CD38 presentan autoinmunidad parecida al lupus, en edades avanzadas, (Domínguez-Pantoja et al, 2018) esto sugiere que esta molécula puede jugar un papel en el control de enfermedades autoinmunes a través de su expresión en las células B reguladoras. Este reporte y lo encontrado en este trabajo, refuerza la hipótesis de que CD38 juega un papel importante en la función de estas células.

De igual manera ya se había mencionado que las células B1 expresan una alta cantidad de CD5 lo cual podría ser una razón del porque no hubo una diferencia significativatan marcada en la proliferación de estas células al estímulo con CD38 en comparación con el control sin estímulo, debido a que CD5 es un regulador negativo de la supervivencia ya que este se encuentra inhibiendo la translocación de NF- $\kappa$ B (Burgueño, E; Mier-Aguilar, C; Soldevila, G,2018; Lankester AC). Aunque por otro lado se ha descrito que la respuesta a CD38 desencadena la degradación de I $\kappa$ - $\alpha$  provocando la translocación a núcleo (Moreno, M; López, L; Zentella A, Humphries LA, Rawlings DJ, Santos-Argumedo L., 2005).

En resumen, con estos datos no fue posible definir o detectar una posible participación reguladora de la molécula CD38 en las células B1 de cavidad peritoneal. Para confirmar y profundizar estos datos sería recomendable también hacer estudios en ratones deficientes de CD38 e IL-10, además estudiar las vías de señalización rio abajo de CD38 en células B de cavidad peritoneal.

## **CONCLUSIÓN**

Los datos presentados en este trabajo demuestran que existe una expresión diferencial de CD38 entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos B. Por otro lado, los datos sugieren que se induce la producción de IL-10 ante el estímulo de CD38 en linfocitos B1 y 2. En lo que respecta a la capacidad de proliferación no se encontró una diferencia significativa entre el estímulo de CD38 y la combinación de este con el bloqueo de la señal de IL-10.

## **PERSPECTIVAS**

Separar las poblaciones de cavidad peritoneal para evaluar la respuesta diferencial en cada una de las subpoblaciones ante el estímulo de CD38.

Evaluar la capacidad autoreguladora de las células B1 en ratones deficientes de CD38 e IL-10

Evaluar la vía de señalización mediada por CD38 en las células B1

## BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Abbas, A. (2018). *Cellular and molecular immunology*. Elsevier. Amsterdam.
- ✓ Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L., & Wang, P. (2015). The role of B-1 cells in inflammation. *Immunologic research*, 63(1-3), 153–166. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8708-3>
- ✓ Baumgarth N. A Hardy(y). (2017). Look at B-1 Cell Development and Function. *J Immunol*, 199(10):3387–3394.
- ✓ Berland, R., & Wortis, H. H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annual review of immunology*, 20, 253–300. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833>
- ✓ Burgueño-Bucio, E., Mier-Aguilar, C. A., & Soldevila, G. (2019). The multiple faces of CD5. *Journal of leukocyte biology*, 105(5), 891–904. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-226R>
- ✓ Coffre, M., & Koralov, S. B. (2017). miRNAs in B Cell Development and Lymphomagenesis. *Trends in molecular medicine*, 23(8), 721–736. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.06.001>
- ✓ Domínguez-Pantoja, M., López-Herrera, G., Romero-Ramírez, H., Santos-Argumedo, L., Chávez-Rueda, A. K., Hernández-Cueto, Á., Flores-Muñoz, M., & Rodríguez-Alba, J. C. (2018). CD38 protein deficiency induces autoimmune characteristics and its activation enhances IL-10 production by regulatory B cells. *Scandinavian journal of immunology*, 87(6), e12664. <https://doi.org/10.1111/sji.12664>
- ✓ Donís-Hernández, F. R., Parkhouse, R. M., & Santos-Argumedo, L. (2001). Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice. *European journal of immunology*, 31(4), 1261–1267. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200104\)31:4<1261::AID-IMMU1261gt;3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200104)31:4<1261::AID-IMMU1261gt;3.0.CO;2-H)
- ✓ Dorshkind, K., & Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature reviews. Immunology*, 7(3), 213–219. <https://doi.org/10.1038/nri2019>
- ✓ Ge, Y., Long, Y., Xiao, S., Liang, L., He, Z., Yue, C., Wei, X., & Zhou, Y. (2019). CD38 affects the biological behavior and energy metabolism of

- nasopharyngeal carcinoma cells. International journal of oncology*, 54(2), 585–599. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4651>
- ✓ Hage, D. S., & Matsuda, R. (2015). Affinity chromatography: a historical perspective. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1286, 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2447-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2447-9_1)
  - ✓ Hanack, K., Messerschmidt, K., & Listek, M. (2016). Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Advances in experimental medicine and biology*, 917, 11–22. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_2)
  - ✓ Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2015). Perspectives on fetal derived CD5+ B1 B cells. *European journal of immunology*, 45(11), 2978–2984. <https://doi.org/10.1002/eji.201445146>
  - ✓ Hermanson, G; 2013. Chapter 15 - Immobilization of Ligands on Chromatography Supports. *Bioconjugate Techniques* (Third edition). Pages 589-740.
  - ✓ Kantor A. B. (1991). The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunology today*, 12(11), 389–391. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90136-H](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90136-H)
  - ✓ Koch, M. A., Reiner, G. L., Lugo, K. A., Kreuk, L. S., Stanbery, A. G., Ansaldo, E., Seher, T. D., Ludington, W. B., & Barton, G. M. (2016). Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell*, 165(4), 827–841. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.055>
  - ✓ Lankester, A. C., van Schijndel, G. M., Cordell, J. L., van Noesel, C. J., & van Lier, R. A. (1994). CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *European journal of immunology*, 24(4), 812–816. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240406>
  - ✓ Lim, S., Manus, H. P., Gooley, A. A., Williams, K. L., & Rylatt, D. B. (1998). Purification of monoclonal antibodies from ascitic fluid using preparative electrophoresis. *Journal of chromatography. A*, 827(2), 329–335. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(98\)00847-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(98)00847-4)
  - ✓ Madadlou, A., O'Sullivan, S., & Sheehan, D. (2011). Fast protein liquid chromatography. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 681, 439–447. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_25)
  - ✓ McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

- ✓ Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., & Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nature immunology*, 7(3), 293–301. <https://doi.org/10.1038/ni1301>
- ✓ Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- ✓ Moreno-García, M. E., López-Bojórques, L. N., Zentella, A., Humphries, L. A., Rawlings, D. J., & Santos-Argumedo, L. (2005). CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)-gamma 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(5), 2687–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2687>
- ✓ Murphy, P. (2016). *Janeway's immunology*. Garland science. New york.
- ✓ Neoh, S. H., Gordon, C., Potter, A., & Zola, H. (1986). The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid. *Journal of immunological methods*, 91(2), 231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90483-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90483-7)
- ✓ Nezlin, R., & Ghetie, V. (2004). Interactions of immunoglobulins outside the antigen-combining site. *Advances in immunology*, 82, 155–215. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)82004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)82004-2)
- ✓ Nikolic, T., Dingjan, G. M., Leenen, P. J., & Hendriks, R. W. (2002). A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *European journal of immunology*, 32(3), 686–692. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<686::AID-IMMU686>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<686::AID-IMMU686>3.0.CO;2-I)
- ✓ Owen, J. (2014), *kuby immunology*. WH. Freeman and Comapany. New york.
- ✓ Penninger, J. M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., & Oliveira-dos-Santos, A. J. (2001). CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nature immunology*, 2(5), 389–396. <https://doi.org/10.1038/87687>
- ✓ Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Robbins, C. S., Weber, G. F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I., Tiglao, E., Figueiredo, J. L., Iwamoto, Y., Theurl, I., Gorbатов, R., Waring, M. T., Chicoine, A. T., Mouded, M., Pittet, M. J., Nahrendorf, M., Weissleder, R., & Swirski, F. K. (2012). Innate response

- activator B cells protect against microbial sepsis. Science (New York, N.Y.), 335(6068), 597–601. <https://doi.org/10.1126/science.1215173>*
- ✓ *Rendón, M. (2008) Mecanismo molecular de diversificación de inmunoglobulinas. REB 27(1):19-29. [http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/01/g\\_Articulo3.pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/01/g_Articulo3.pdf)*
  - ✓ *Reth, M; Nitschke, L; Hikida, M y Kurosaki, T., (2015). Chapter 10 - Structure and Signaling Function of the B-Cell Antigen Receptor and Its Coreceptors. Molecular Biology of B Cells (Second Edition).Pages 151-170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397933-9.00010-2>*
  - ✓ *Rodig, S. J., Shahsafaei, A., Li, B., & Dorfman, D. M. (2005). The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. Human pathology, 36(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.10.016>*
  - ✓ *Roitt, I. (2014). Roitt's essential immunology. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires.*
  - ✓ *Romero-Ramírez, H., Morales-Guadarrama, M. T., Pelayo, R., López-Santiago, R., & Santos-Argumedo, L. (2015). CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. Immunology, 144(2), 271–281. <https://doi.org/10.1111/imm.12370>*
  - ✓ *Santos-Argumedo L. (2012) CD38. In: Choi S. (eds) Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0461-4\\_278](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0461-4_278)*
  - ✓ *Shouval, D. S., Ouahed, J., Biswas, A., Goettel, J. A., Horwitz, B. H., Klein, C., Muise, A. M., & Snapper, S. B. (2014). Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. Advances in immunology, 122, 177–210. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00005-5>*
  - ✓ *Sindhava, V., Woodman, M. E., Stevenson, B., & Bondada, S. (2010). Interleukin-10 mediated autoregulation of murine B-1 B-cells and its role in *Borrelia hermsii* infection. PloS one, 5(7), e11445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011445>*
  - ✓ *Skoog, D. (2014). Fundamentos de química analítica. 9 ed.Cengage Learning Editores.*

- ✓ Stall, A., Adams, S., Herzenberg, L., and Kantor, A. (1992). *Characteristics and Development of the Murine B-1b (Ly-1 B Sister) Cell Population*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651(1), 33–43.
- ✓ Trujillo, A. (2011). *Efecto del entrecruzamiento de CD38 en la proliferación de las células B1 de la cavidad peritoneal de ratón y su autorregulación por IL-10*. Tesis de maestría. Cinvestav.
- ✓ UniProt Consortium (2021). *UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021*. *Nucleic acids research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- ✓ Vences-Catalán, F., & Santos-Argumedo, L. (2011). *CD38 through the life of a murine B lymphocyte*. *IUBMB life*, 63(10), 840–846. <https://doi.org/10.1002/iub.549>
- ✓ Walter M. R. (2014). *The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling*. *Current topics in microbiology and immunology*, 380, 191–212. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_9)
- ✓ Weber, G. F., Chousterman, B. G., Hilgendorf, I., Robbins, C. S., Theurl, I., Gerhardt, L. M., Iwamoto, Y., Quach, T. D., Ali, M., Chen, J. W., Rothstein, T. L., Nahrendorf, M., Weissleder, R., & Swirski, F. K. (2014). *Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis*. *The Journal of experimental medicine*, 211(6), 1243–1256. <https://doi.org/10.1084/jem.20131471>
- ✓ Zhou, Y., Li, Y. S., Bandi, S. R., Tang, L., Shinton, S. A., Hayakawa, K., & Hardy, R. R. (2015). *Lin28b promotes fetal B lymphopoiesis through the transcription factor Arid3a*. *The Journal of experimental medicine*, 212(4), 569–580. <https://doi.org/10.1084/jem.20141510>

## **ANEXO**

### **SM Medio de Tinción**

3.5 % suero fetal bovino

0.02 % azida de sodio

1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) sln.

Aforar a 1 L con HEPES-BSS

### **HEPES**

1.68 M HEPES

1.68 M NaOH

### **BSS Solución salina amortiguadora**

897 mL de ddH<sub>2</sub>O

88 mL de NaCl 1.68 M

2.2 mL de KCl 1.68 M

2.2 mL 1.12 M CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O

740  $\mu$  L 1.68 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

1.5 mL de amortiguador fosfato de potasio y 8.8 mL de amortiguador HEPES

### **PBS 1X, 1 L:**

PBS 10 X, 1 L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O.....21.7g.

KCl.....2g.

NaCl.....80.

KHPO<sub>4</sub>.....2g.

Colocar 100 mL PBS 10X y aforar a un 1 L (pH=7.2-7.3)