



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores**

**Cuautitlán**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE  
SISTÉMICA Y MUCOSAL ANTE LA INMUNIZACIÓN  
PERINATAL EN UN MODELO PORCINO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTAN:**

**ALICIA LAURA GAMA ESPINOSA**

**CARLOS EMILIO GARCÍA RUIZ**

**ASESOR: DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ**



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  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO**  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ**  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluación de la respuesta inmune sistémica y mucosal ante la inmunización perinatal en un modelo porcino

Que presenta la pasante: Alicia Laura Gama Espinosa

Con número de cuenta: 303268288 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 17 de junio de 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Marco Antonio Vega López	
<b>VOCAL</b>	Dr. Andrés Romero Rojas	
<b>SECRETARIO</b>	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Ladislao Palomar Morales	
<b>2do SUPLENTE</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO**  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ**  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluación de la respuesta inmune sistémica y mucosal ante la inmunización perinatal en un modelo porcino

Que presenta el pasante: Carlos Emilio García Ruiz  
Con número de cuenta: 303169910 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 17 de junio de 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Marco Antonio Vega López	
<b>VOCAL</b>	Dr. Andrés Romero Rojas	
<b>SECRETARIO</b>	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Ladislao Palomar Morales	
<b>2do SUPLENTE</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

Este proyecto fue parcialmente financiado por el CONACyT (proyecto 60941) y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con el número de proyecto ICYTDF/323/2009.

Responsable del proyecto Dr. Marco Antonio Vega López.

La educación es la vacuna contra la  
violencia.

*Edward James Olmos*

Lo que sabemos es una gota de agua; lo  
que ignoramos es el océano.

*Isaac Newton*

La vida es una competencia larga y  
dura, pero al final, solamente  
competimos contra nosotros mismos.

*Anónimo*

Hay una fuerza motriz más poderosa  
que el vapor, la electricidad y la energía  
atómica. Esa fuerza es la voluntad.

*Albert Einstein*

## **DEDICATORIAS**

A mis padres (Manuela y Miguel)

*Por todo el apoyo, la paciencia y confianza que me han dado, porque siempre me han hecho sentir capaz y segura de lo que deseo y porque sin ellos jamás hubiera llegado hasta aquí. GRACIAS por darme la oportunidad de vivir y estudiar. Los adoro*

A mi abuelita Licha

*Porque sé que desde allá arriba sigue cuidando cada paso que doy. Te extraño*

A mi hermano José Miguel

*Por los consejos que me da siempre en el momento indicado y por ser un gran amigo y un buen ejemplo a seguir. Te quiero malbicho*

A toda mi familia

*Porque a pesar de las diferencias que podamos tener siempre me han apoyado y comprendido. Gracias a cada uno de ustedes, los quiero*

A mis amigos

*Porque sin ellos el paso por la vida no hubiera sido igual de comprometido, misterioso, intenso y divertido; pero sobre todo por aceptarme tal como soy y dejarme ser parte de ustedes. Los quiero*

A Carlos García

*Por ser el mejor compañero de carrera que puede existir y por aceptar ser mi aliado en esta tesis. Gracias porque sin tu ayuda jamás lo habría logrado.*

**ALICIA LAURA GAMA ESPINOSA**

## A Dios

*Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por la fuerza y motivación que siempre me brindaste en tu infinito amor al no dejarme solo.*

## A ti Madre

*Por haberme ayudado en todo momento, soportando mis errores y fracasos. Por tus consejos y motivaciones que me han permitido ser una persona de bien. Pero sobre todo GRACIAS por darme la vida y llenarme de amor. ¡TE QUIERO MUCHO!*

## A ti Padre

*A quien debo la vida y aunque no siempre estuviste a mi lado sé que me quieres al igual que yo lo hago.*

## A mis hermanos

*En quienes por encima de las bromas siempre encontré un apoyo, mismo que se ha incrementado al ser químicos como yo. Gracias por ser mis compañeros de juego pero sobre todo de vida.*

## A Alicia Gama

*Por ser un gran pedacito de motivación que me alienta a ser mejor cada día. Gracias por sufrir y disfrutar a mi lado los grandes placeres de escribir esta tesis.*

**CARLOS EMILIO GARCÍA RUIZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer con todo cariño y respeto:

A nuestro tutor, el Dr. Marco Antonio Vega López por permitirnos formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza, apoyo, paciencia y dedicación en la elaboración de esta tesis, pero sobre todo por compartirnos su gran experiencia.

A la Bióloga María del Carmen Ramírez Estudillo, a los M. en C. Ángel de Jesús Balam May y Edgar Rodrigo Guzmán Bautista por su aporte de conocimientos y experiencia sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible. Del mismo modo a todo el personal del laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN por su apoyo, colaboración, compañerismo y buenos momentos.

A los MMVVZZ. Manuel Flores y Daniel Cortés por su apoyo técnico en el manejo y cuidado de los animales; así como a todo el personal del bioterio del CINVESTAV-IPN.

A todos nuestros profesores por su tiempo, dedicación y apoyo, por transmitirnos sus conocimientos y formarnos profesionalmente, especialmente al Dr. Andrés Romero, al MVZ. Ángel Martínez, al OFB. Ladislao Palomar y al Dr. Salvador Fonseca por formar nuestro jurado y darse el tiempo de revisar, sugerir y corregir este trabajo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a la **FES. Cuautitlán** que nos dieron la oportunidad de formar parte de ellas y cumplir uno de nuestros más grandes deseos.

***GRACIAS***

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. SISTEMA INMUNOLÓGICO NEONATAL.....	2
1.1.1. Consideraciones anatómicas.....	3
1.2. LAS MUCOSAS COMO VÍA DE ENTRADA PARA LOS PATÓGENOS .....	5
1.3. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSA (MALT).....	6
1.3.1. Tejido linfoide asociado a nariz (NALT).....	7
1.3.2. Tejido linfoide asociado a bronquios (BALT).....	8
1.4. RESPUESTA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR ANTICUERPOS EN LA MUCOSA .....	9
1.4.1. Inmunoglobulina A (IgA) .....	10
1.4.2. Inmunoglobulina G (IgG).....	13
1.5. INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS .....	15
1.5.1. Linfocitos T.....	15
1.5.2. Linfocitos gama delta.....	16
1.5.3. Linfocitos CD25 .....	19
1.6. LIMITACIONES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO PARA RESPONDER EN EDADES TEMPRANAS.....	21
1.7. PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN .....	24
1.8. MODELO EXPERIMENTAL .....	25
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL .....	27
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	27
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>

7.1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL .....	40
7.2. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES .....	48
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
8.1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL .....	55
8.2. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES .....	63
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>11. ANEXO .....</b>	<b>68</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>

## ABREVIATURAS

°C	Centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APC (del inglés, <i>Antigen Presenting Cells</i> )	Célula presentadora de antígeno
APP (del inglés, <i>Antimicrobial Proteins and Peptides</i> )	Proteínas y péptidos antimicrobianos
ASC (del inglés, <i>Antibody Secretory Cells</i> )	Célula secretora de anticuerpos
BALT (del inglés, <i>Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i> )	Tejido linfoide asociados a bronquios
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
cols.	Colaboradores
ConA	Concanavalina A
CXCL2	Quimiocina 2
CXCL8	Quimiocina 8
DC (del inglés, <i>Dendritic Cells</i> )	Células dendríticas
DP	Doble positivo
ELISA (del inglés, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAE (del inglés, <i>Follicle-Associated Epithelium</i> )	Epitelio asociado a folículos
FcαR	Receptor Fc α
FcRn	Receptor Fc neonatal
FDC (del inglés, <i>Follicular Dendritic Cells</i> )	Célula dendrítica folicular
g	Gramo

<b>xg</b>	x veces la gravedad
<b>GC (del inglés, <i>germinal centers</i>)</b>	Centros germinales
<b>HβD2</b>	Defensina humana beta 2
<b>HEV (del inglés, <i>High Endothelium Venule</i>)</b>	Vénulas del endotelio alto
<b>Hr</b>	Hora
<b>IDR</b>	Intradermorreacción
<b>IFN-γ</b>	Interferón gama (γ)
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IN</b>	Intranasal
<b>IRAK-1 (del inglés, <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)</b>	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>kg</b>	kilogramo
<b>KIR's</b>	Receptores inhibidores de células NK
<b>LBA</b>	Lavado bronquio alveolar
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>L</b>	Litros
<b>LTC</b>	Linfocito T citotóxico
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros cuadrados
<b>MALT (del inglés, <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>)</b>	Tejido linfoide asociado a mucosa
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MHC-I (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex I</i>)</b>	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
<b>MHC-II (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex II</i>)</b>	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
<b>mL</b>	Mililitro

<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NALT (del inglés, <i>Nasal-Associated Lymphoid Tissue</i>)</b>	Tejido linfoide asociado a nariz
<b>NFκB</b>	Factor nuclear κ B
<b>NK (del inglés, <i>Natural Killer</i>)</b>	Células asesinas naturales
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora de fosfatos
<b>PFA</b>	Proteínas de fase aguda
<b>pIg</b>	Inmunoglobulina polimérica
<b>pIgR</b>	Receptor de inmunoglobulina polimérica
<b>PMSF (del inglés, <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i>)</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PP</b>	Placas de Peyer
<b>RIN</b>	Refuerzo intranasal
<b>SC (del inglés, <i>Secretory Component</i>)</b>	Componente secretor
<b>SubC</b>	Subcutáneo
<b>SIgA</b>	Inmunoglobulina A secretora
<b>SPF (del inglés, <i>Specific Pathogens Free</i>)</b>	Libre de patógenos específicos
<b>SSF</b>	Solución salina fisiológica
<b>TCR (del inglés, <i>T Cells Receptor</i>)</b>	Receptor de célula T
<b>TGF-β ( del inglés, <i>β-GrowTransformant Factor</i>)</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TLCK (del inglés, <i>Na-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride</i>)</b>	Clorhidrato de Na-tosyl-L-lisina clorometil cetona
<b>TLR (del inglés, <i>Toll-like receptor</i>)</b>	Receptor tipo toll
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>TPCK (del inglés, <i>N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone</i>)</b>	N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>V</b>	Volts

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de inducción de respuestas inmunológicas a nivel de mucosas. ....	7
Figura 2. Sitios inductores y efectores en mucosas. ....	9
Figura 3. Transcitosis de inmunoglobulina A polimérica (pIgA).. ....	11
Figura 4. Representación esquemática de un dímero de SIgA. ....	12
Figura 5. Papel de las células T $\gamma\delta$ en la respuesta inmunológica innata y adaptativa.....	18
Figura 6. Dos clases de células T reguladoras. ....	21
Figura 7. Metodología experimental. ....	28
Figura 8. Diagrama del patrón de llenado de la placa de ELISA ....	31
Figura 9. Diagrama del patrón de llenado de la placa de fondo plano para cultivo ....	37
Figura 10. Diagrama del patrón de llenado de la placa para tinción de citometría ....	38
Figura 11. Concentración sérica de IgG e IgA [ng/mL] anti OVA en cerdos inmunizados a diferentes edades.....	42
Figura 12. Concentración de IgG e IgA [ng/mL] anti OVA en saliva de cerdos inmunizados a diferentes edades. ....	44
Figura 13. Concentración de IgG e IgA [ng/mL] anti OVA en secreción nasal de cerdos inmunizados a diferentes edades. ....	46
Figura 14. Concentración de IgG e IgA [ng/mL] anti OVA en LBA de cerdos de 3 meses de edad que fueron inmunizados a diferentes edades.....	47
Figura 15. Determinación de poblaciones de linfocitos CD3 en el control de isotipo de células de sangre estimuladas. ....	48
Figura 16. Determinación de poblaciones de linfocitos CD25 en el control de isotipo de células de sangre sin estímulo ....	49
Figura 17. Porcentajes de linfocitos CD25+ en células de sangre estimuladas con ConA	52
Figura 18. Porcentajes de linfocitos CD25+ en células de ganglio estimuladas con ConA. ....	53
Figura 19. Porcentajes de linfocitos CD25+ en células de pulmón estimuladas con ConA. ....	54

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Limitaciones intrínsecas y extrínsecas de linfocitos B de los neonatos .....	23
Tabla 2. Anticuerpos primarios contra marcadores celulares para citometría de flujo. ....	39
Tabla 3. Anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos .....	39
Tabla 4. Longitudes de onda y canales para cada fluorocromo.....	40
Tabla 5. Diferencia estadísticamente significativa entre células sin estímulo y las estimuladas con ConA para las distintas subpoblaciones y grupos experimentales analizados. ....	51

## RESUMEN

Las mucosas son la interfase entre el organismo y el medio externo, el tracto respiratorio es un ejemplo de estas áreas, su superficie es de aproximadamente 60 m<sup>2</sup> y diariamente inhala 11,000 L de aire, por lo que dicha zona se encuentra expuesta continuamente a una enorme cantidad de material antigénico y constituye una barrera equipada con mecanismos de defensa contra amenazas del medio ambiente. Sin embargo, la capacidad de respuesta del sistema inmunológico no es la misma a lo largo de la vida, siendo el periodo neonatal una ventana crítica para el aumento de las infecciones. Afortunadamente, la inmunidad en niños es susceptible de incrementarse a través de la vacunación, generando un notable impacto sobre la morbilidad y mortalidad en esa población, pero no se tiene información sobre la edad óptima de inmunización perinatal para inducir una respuesta inmunológica efectiva especialmente en mucosas. En este estudio, se evaluó la respuesta inmunológica humoral y celular antígeno (Ag)-específica generada tras la inmunización en el periodo neonatal en un modelo porcino. Se observó que, a nivel sistémico, la respuesta de anticuerpos (Abs) IgA e IgG fue significativamente más alta en animales inmunizados a mayor edad, equiparable con la respuesta de IgG en secreciones (saliva, moco), mientras que el análisis de IgA en secreciones fue significativamente más alta en animales inmunizados a menor edad. Esto confirma la compartimentalización del sistema inmunológico y el efecto de las condiciones del medio como determinantes de la respuesta. Por otra parte, la respuesta celular “*in vitro*”, no pudo ser demostrada por citometría de flujo, lo que sugiere que el protocolo empleado de inmunización subcutáneo/subcutáneo/intranasal (SubC/SubC/IN) generó principalmente una respuesta de perfil Th2. Por lo tanto, se concluyó que la inmunización perinatal genera una respuesta inmunológica que, a nivel sistémico se ve favorecida en animales de dos semanas de edad, mientras que a nivel mucosal (secreciones) se evidencia en animales más jóvenes.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es un complejo conjunto de órganos, células y sustancias químicas capaces de identificar los peligros potenciales para el cuerpo, así como su eliminación mediante el montaje de una respuesta inmunológica (Beck y Gail, 1996; Schneider, 2005).

El sistema inmunológico protege contra los virus, bacterias y parásitos que pueden causar enfermedades. Éste responde a los antígenos, un Ag es una sustancia que estimula una respuesta inmunológica específica, entre ellas la producción de Abs; esto implica, básicamente, el reconocimiento de formas. Los Ags son usualmente proteínas o polisacáridos, pero pueden ser cualquier tipo de molécula. Los agentes infecciosos como los virus y las bacterias tienen Ags únicos que el sistema inmunológico reconoce (Beck y Gail, 1996; Schneider, 2005).

La capacidad de respuesta del sistema inmunológico no es la misma a lo largo de la vida; se ha observado que en el periodo neonatal, las infecciones son una causa importante de morbilidad y mortalidad, lo cual parece indicar que los neonatos son incapaces de desarrollar respuestas inmunológicas eficaces durante la etapa de los retos inmunológicos primarios, contribuyendo a que sea más susceptible a las infecciones (Pérez, 2010).

La inmunidad en niños es fácilmente susceptible de inducirse a través de la vacunación, acción que genera un notable impacto sobre la morbilidad y mortalidad en este tipo de población, sin embargo, no se tiene información sobre la edad óptima de inmunización perinatal para inducir una respuesta inmunológica efectiva sobre todo en mucosas (Siegrist y Aspinall, 2009). Para estudiar dicho problema, en un modelo de minicerdo vietnamita, se analizaron las respuestas de Abs séricos y mucosales contra el Ag ovoalbúmina (OVA) después de la inmunización temprana, con el fin de conocer la edad óptima de vacunación y tener datos que ayuden a diseñar protocolos de inmunización efectivos.

### **1.1.Sistema inmunológico neonatal**

La edad neonatal se caracteriza por un delicado proceso de adaptación a la vida extrauterina. Aunque la transferencia de inmunidad materna protege al neonato, esa protección es transitoria e insuficiente. Además, la protección inmunológica temprana inicialmente se basa en inmunoglobulinas G (IgG) (particularmente de subclase IgG1) (Gasparoni y cols., 1992) de origen materno, los niveles de ésta disminuyen después del nacimiento con una vida media de 21-30 días (Avanzini y cols., 1998). Por lo tanto, los niños se vuelven vulnerables a las infecciones dentro de un corto período de tiempo (entre el primer y tercer mes de vida) (Fernandez y cols., 1994), sin el desarrollo de su inmunidad adaptativa para conferir protección sostenida. El sistema inmunológico es particularmente afectado por problemas de adaptación, de hecho, una competencia inmunológica madura podría tener efectos desfavorables debido a la incompatibilidad antigénica materno-fetal, además de ser innecesaria para el feto, que se desarrolla en un área libre de gérmenes (Lewis y Tu, 2004). El recién nacido, por el contrario, debe ser capaz de defenderse contra microorganismos patógenos del medio ambiente. Como resultado de estos requisitos contradictorios, el sistema inmunológico está incompletamente desarrollado al nacer, colocando al recién nacido en una situación difícil (Lewis y Wilson, 2001; Cunningham-Rundles, 2004).

El incremento en la susceptibilidad a infecciones en los recién nacidos, especialmente en los prematuros, ha sido bien documentada (Gans y cols., 1998; Siegrist y Aspinall, 2009). La inexperiencia antigénica y la prevalencia de factores de supresión durante la vida fetal son responsables de la inmadurez "fisiológica" de la función inmunológica en los recién nacidos (Lewis y Wilson, 2001; Lewis y Tu, 2004). Se ha reportado en los neonatos una producción y/o capacidad funcional limitada de todos los componentes celulares del sistema inmunológico (Arkachaisri y Ballow, 1999; Marshall-Clarkie y cols., 2000); además, se han documentado deficiencias cuantitativas y cualitativas de los componentes humorales del sistema inmunológico de los neonatos en relación al de los adultos (Paniagua y cols., 2003).

### **1.1.1. Consideraciones anatómicas**

Luego del nacimiento, la piel y el intestino del lechón se colonizan rápidamente por bacterias, con el objetivo de prevenir las infecciones y al mismo tiempo, evitar la generación de respuestas inflamatorias excesivas, existe una distribución particular de moléculas inmunológicas en la piel y el epitelio mucoso del lechón, a la vez que tiene lugar una respuesta de fase aguda en la sangre periférica (Robledo y Robledo, 2003).

#### **Piel**

El vérnix caseoso que recubre la piel de los lechones contiene las denominadas proteínas y péptidos antimicrobianos (APP), como la lisozima, las defensinas y los ácidos grasos libres con actividad antibacteriana, entre otros (Stites y cols., 1998).

#### **Tracto intestinal**

El intestino fetal se encuentra repleto de líquido amniótico estéril. Luego del nacimiento, hay una rápida transición hacia la colonización intestinal primaria, lo cual representa un desafío para el sistema inmunológico innato. Los enterocitos del intestino delgado fetal expresan en la membrana basolateral el receptor tipo toll 2 (TLR2) y el receptor tipo toll 4 (TLR4) entre las 18 y 21 semanas de gestación. La estimulación de las células intestinales fetales por lipopolisacáridos (LPS) produce activación del factor nuclear kappaB (NFκB) y la producción de las quimiocinas CXCL8 y CXCL2. Sin embargo, una respuesta inflamatoria exagerada puede significar un riesgo para el lechón frente a las bacterias intestinales gram negativas. Por esta razón, la exposición del intestino perinatal a los LPS genera una baja expresión de las cinasas asociadas a interleucina 1 (IRAK-1), intermediario en la traducción de señales del TLR4, con disminución en la capacidad de respuesta de las células intestinales a los LPS. Esta tolerancia posnatal a las endotoxinas parece favorecer la adaptación del neonato a la colonización microbiana posterior y el mantenimiento de la homeostasis hospedero-microbio, necesaria para el establecimiento de una relación de comensalismo (Insoft y cols., 1996; Björkstén y cols., 2001).

## Plasma

Los lechones tienen menor concentración de los componentes del complemento, lo cual puede generar mayor dificultad para controlar las bacteremias y para producir respuestas inmunitarias adecuadas (Paniagua y cols., 2003).

La adenosina es un nucleósido que aumenta en respuesta a la hipoxia y tiene propiedades inmuno-modulatorias. En la sangre del cordón umbilical neonatal existen concentraciones elevadas de adenosina que, al actuar sobre los receptores de adenosina A3 en las células mononucleares, inhibe la síntesis del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mediada por TLR2 (Walker y Goldstein, 2007).

La síntesis de proteínas de fase aguda (PFA), estimulada por interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6), aumenta de modo muy intenso durante la primera semana luego del nacimiento. Dado que muchas PFA tienen acción en la depuración o detoxificación de LPS y de otros agonistas de receptor tipo toll (TLR), el objetivo del aumento posnatal de estos productos consistiría en controlar la translocación de productos bacterianos que pudieran haber atravesado la mucosa intestinal (Levy, 2007).

## Tracto respiratorio

La exposición del epitelio respiratorio a agonistas TLR, como las endotoxinas, genera IL-1 $\beta$ ; esto induce la expresión de la defensina humana beta 2 (H $\beta$ D2) y, finalmente, la activación de la expresión de los APP. De esta manera, la expresión de H $\beta$ D2, la defensina predominante en el epitelio respiratorio neonatal, es regulada e inducida por la IL-1 $\beta$ . La concentración de H $\beta$ D2 en el epitelio respiratorio neonatal aumenta en forma paralela con la edad gestacional (Rivas y cols., 2006).

La exposición a las endotoxinas contenidas en el polvo ambiental (agonistas TLR4) a partir de los 3 meses de vida se ha asociado con una capacidad potenciada de generar respuestas tipo Th1 con síntesis de interferón gama (IFN- $\gamma$ ). Estos hallazgos demuestran que la exposición a agonistas TLR en edades tempranas de la vida acelera la maduración de la respuesta Th1 y protege contra trastornos alérgicos y atópicos (Levy, 2007; Walker y Goldstein, 2007).

En el nacimiento es abundante la presencia de células T regulatorias CD4+CD25+, las que inhiben la respuesta inmunológica Th1 y favorecen la tolerancia inmunológica. La activación de TLR puede estimular las respuestas Th1 al revertir el efecto de las células reguladoras, de forma indirecta por la secreción de IL-6 o bien de manera directa por la activación de receptor tipo toll 8 (TLR8) (Levy, 2007).

## **1.2. Las mucosas como vía de entrada para los patógenos**

Las membranas mucosas son la principal vía de entrada de microorganismos, alérgenos y carcinógenos. La superficie más vulnerable y extensa son los 340 m<sup>2</sup> de mucosa gastrointestinal (casi 200 veces mayor que la superficie cutánea que abarca de 1.5 a 2 m<sup>2</sup>), seguida de la respiratoria 60 m<sup>2</sup>, pero también la mucosa de las vías urogenital y la conjuntiva que recubre los ojos. Este sistema protector está formado por la mayor colección de células inmuno competentes del organismo (Brandtzaeg, 1995; Pilette y cols., 2001; Debertain y cols., 2003; Arranz y Garrote, 2006).

Cada respiración lleva en el aire inhalado miles de microorganismos y micro partículas capaces de causar daños al organismo, sin embargo, esta exposición parece bien controlada, por lo tanto, en condiciones normales, las vías del sistema respiratorio parecen estar bien equipadas para eliminar de manera eficiente materiales exógenos sin que se genere una respuesta inflamatoria o inmunológica (Bouvet y Fischetti, 1999). La defensa contra los patógenos del tracto respiratorio se basa en dos mecanismos distintos que se encuentran en las vías respiratorias y el espacio alveolar. En las vías respiratorias, la defensa mecánica parece predominar e incluye la deposición en las superficies nasal y la orofaríngea y la eliminación a través de la tos, estornudos y la remoción mucociliar. Por el contrario, el epitelio alveolar carece de cilios y por lo tanto la remoción de las partículas y microorganismos se basa principalmente en los macrófagos alveolares (Sibille y Reynolds, 1990). Durante la evolución se han desarrollado diversas zonas inmunológicamente especializadas, capaces de responder localmente frente a cualquier agresión del medio externo. Estos puntos de defensa corresponden a organizaciones del tejido linfóide que pueden formar desde acúmulos dispersos de linfocitos, hasta estructuras bien organizadas como las del ganglio linfático y reciben el nombre de tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) (Goronzy y Weyand, 2007).

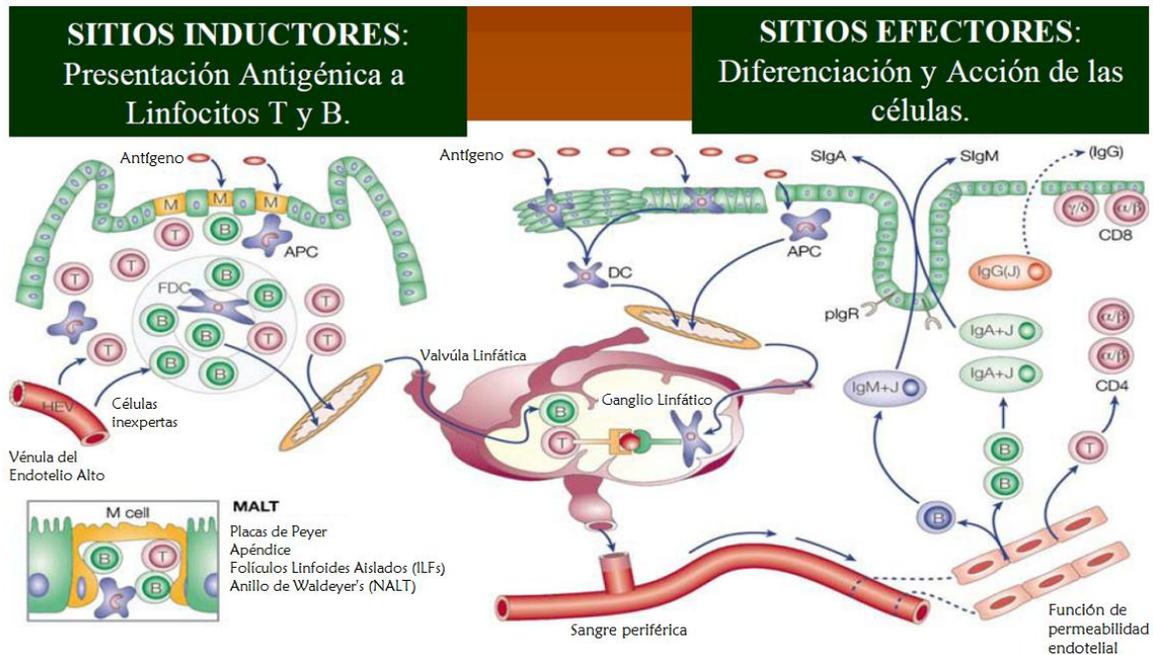
### **1.3. Tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)**

La importancia de estos tejidos está en ser la primera línea de defensa de esta gran superficie, para lo cual el organismo tiene una reserva mayor de células plasmáticas en los tejidos del MALT que la suma de las existentes en bazo, ganglios y médula ósea (Elmore, 2006).

El MALT consiste en agregados de tejido linfoide que se localizan en la lámina propia y áreas submucosas del tracto gastrointestinal donde destacan las Placas de Peyer (PP) del íleon que son 30 a 40 nódulos en esa parte del intestino delgado y un apéndice, en el inicio del intestino grueso. El respiratorio donde se ubican las amígdalas linguales (en la base de la lengua), palatinas (en la parte posterior de la boca) y faríngeas o adenoides. Constan de nódulos linfoides, con linfocitos, macrófagos, granulocitos y mastocitos. Las células B se organizan en numerosos folículos, incluyendo secundarios con sus centros germinales (GC). Poseen un papel defensivo frente a patógenos que entran por los epitelios nasales y orales.

Los tejidos del sistema inmunológico de las mucosas pueden dividirse en sitios inductores como el tejido linfoide asociado a nariz (NALT), el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) y en sitios efectores (Pabst y Binns, 1994). Los sitios inductores comprenden los tejidos linfoides donde las células inmunológicas inexpertas son activadas para convertirse en células efectoras y de memoria. El proceso comienza con la entrada del Ag a través de unas células epiteliales especializadas, denominadas células M, que tienen una membrana muy invaginada (ribete en cepillo) hacia la luz y una concavidad que alberga linfocitos B, T y macrófagos. Estas células M se sitúan en los llamados sitios inductivos, los Ags endocitados por la célula M son transportados a los linfocitos B del folículo subyacente al sitio inductivo. Algunos de estos linfocitos B sensibilizados viajan por la linfa, atraviesan los ganglios linfáticos mesentéricos, pasan por la cisterna del quilo a sangre, desde la circulación sanguínea regresan por capilares a la lámina propia intestinal, donde se distribuyen de modo difuso pero extenso y se diferencian a células plasmáticas especializadas en secretar inmunoglobulina A secretora (SIgA), que atraviesa la capa de células epiteliales y recubre la zona apical que da a la luz. Allí, la SIgA puede interactuar con el Ag que dio origen a la respuesta. El resto de los linfocitos B activados se diferencia

*in situ* y las células plasmáticas liberan IgA en la misma zona efectora (figuras 1 y 2) (Brandtzaeg y cols., 1999; Kiyono y Fukuyama, 2004; Lañez, 2006).



**Figura 1. Esquema de inducción de respuestas inmunitarias a nivel de mucosas.** Los Ags en el lumen son principalmente atrapados por células M en los sitios inductores y entregados a células presentadoras de antígeno (APC), incluyendo macrófagos, células dendríticas (DC) y células B. Las células T en el área parafolicular del folículo linfóide subyacente, se activan y producen citocinas necesarias para la maduración inicial de células B. Las células T y B activadas emigran por el sistema linfático a la sangre periférica y llegan principalmente a la lámina propia y en menor grado a otros tejidos exocrinos. Los linfoblastos B se diferencian en la lámina propia, bajo la influencia de células T CD4+ y APC, en células plasmáticas con secreción de la inmunoglobulina polimérica (pIg). La pIg es selectivamente transportada al lumen mediante un mecanismo llamado transcitosis, es tomada por el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) que se encuentra en el lado basolateral de la célula epitelial y finalmente, es soltada como SIgA, como el Ab principal en la superficie de la mucosa (Kiyono y cols., 1992).

### 1.3.1. Tejido linfóide asociado a nariz (NALT)

Conocido también como anillo de Waldeyer, incluye las amígdalas, las adenoides y gran número de acúmulos linfoides. La génesis del NALT inicia después del nacimiento a través de señales estimulantes proporcionadas por Ags del medio ambiente y mitógenos (Kiyono y Fukuyama, 2004). Por lo tanto, la estimulación del medio ambiente podría ser esencial para la organogénesis y maduración del NALT. Este tejido consiste en epitelio asociado a folículos (FAE), vénulas del endotelio alto (HEV), áreas enriquecidas de células T y B, células M que están especializadas en la captación del Ag (similar a las presentes en

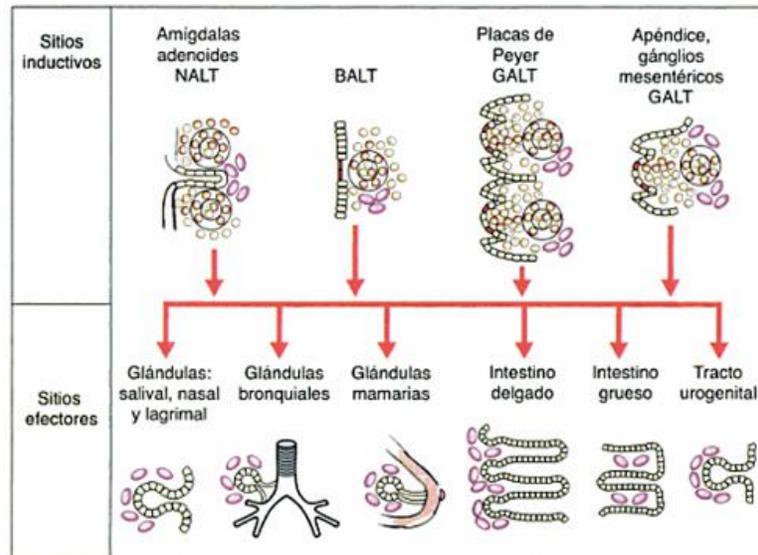
el FAE de las PP), así como APC (incluyendo las DC y los macrófagos). Por lo tanto, el NALT contiene todas las células que son necesarias para la inducción y la regulación de la respuesta inmunológica de la mucosa contra los antígenos que entran por la cavidad nasal. Debido a la capacidad de migrar de las células de memoria y efectoras activadas en el NALT, estas regresan preferencialmente a la mucosa nasal, su sitio inductor (Debertin y cols., 2003; Kiyono y Fukuyama, 2004).

### **1.3.2. Tejido linfoide asociado a bronquios (BALT)**

El BALT es una estructura linfoide organizada que no está pre-programada sino que se desarrolla en respuesta a la infección o en enfermedades inflamatorias crónicas. Las investigaciones han demostrado que el BALT ofrece un nicho para la maduración de células T y la educación de las células B para ayudar en la eliminación de los agentes infecciosos, destacando la posibilidad de que el BALT puede ser diseñado y aprovechado para mejorar la inmunidad protectora contra patógenos respiratorios (Foo y Phipps, 2010). El BALT fue descrito inicialmente como agregaciones foliculares compuestas principalmente de linfocitos. En general, se encuentra a lo largo de las bifurcaciones de la parte superior bronquial (Sminia y cols., 1989). Ahora se reconoce que el BALT es una estructura organizada, con zonas T y B, HEV y células similares a las células M de las PP (Pankow y Von Wichert, 1988; Corr y cols., 2008), células dendríticas foliculares (FDC) que en el BALT se encargan de presentar el Ag, así como proporcionar señales co-estimuladoras que aumentan la activación de células B y la proliferación en los GC (Kosco-Vilbois y cols., 1993).

Una vez que los linfocitos han dejado los sitios inductivos tienen como destino el BALT. Una parte de sus funciones está relacionada con la respuesta inmunológica mucosal y más específicamente a la producción de IgA (Pilette y cols., 2001). En especies como conejos y ratas el BALT es un órgano linfoide constitutivo, presente al momento del nacimiento. En el hombre, el BALT no está en el pulmón saludable (Pabst y Binns, 1994). En los cerdos, el BALT tampoco es una estructura linfoide presente desde el nacimiento y está ausente en los animales libres de gérmenes. Por lo tanto, con respecto a los factores que influyen la aparición, el número, tamaño y composición celular del BALT, el pulmón

de cerdo podría ser un buen modelo para correlacionar con el humano (Pabst y Binns, 1994).



**Figura 2.** *Sitios inductores y efectores en mucosas* (Gerdt y cols., 2006).

#### 1.4. Respuesta inmunológica mediada por anticuerpos en la mucosa

Entre las moléculas efectoras del sistema inmunológico los Abs son, sin lugar a dudas, cruciales para el control de infecciones, especialmente para aquellas producidas por microorganismos extracelulares o los que su ciclo de vida transcurre con una etapa extracelular. Claras evidencias de esto se encontraron en la naturaleza cuando se informó que niños que tenían dificultades para producir inmunoglobulinas eran muy susceptibles a las infecciones, las cuales frecuentemente resultaban fatales (Gitlin y cols., 1956). Sin embargo, los Abs no siempre tienen un papel protector ya que pueden ser responsables de daño tisular en procesos autoinmunes (Lipsky, 2001; Jonsson y cols., 2001) y mediadores de procesos alérgicos (Broide, 2001).

### **1.4.1. Inmunoglobulina A (IgA)**

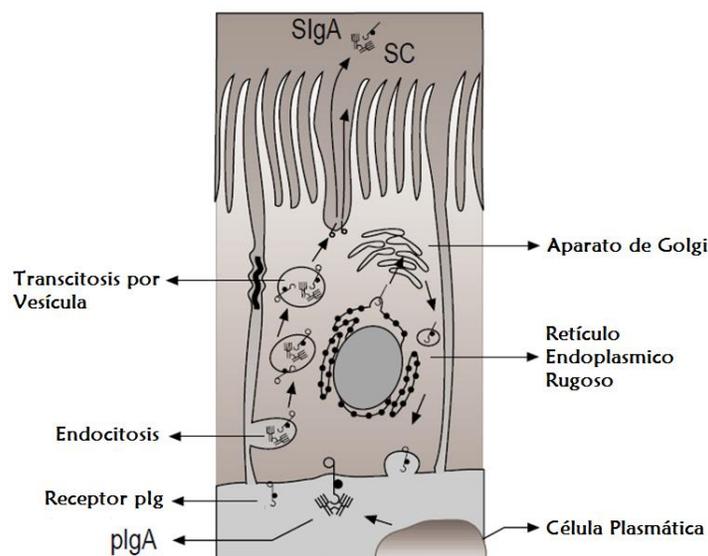
Las respuestas inmunológicas que tienen lugar en las mucosas se caracterizan por ser de SIgA. Estos Abs representan la clase predominante en secreciones exteriores y la mejor protección específica para las superficies de la mucosa por el bloqueo mediante fijación de las bacterias y los virus. La SIgA constituye más del 80% de todos los Abs producidos en el MALT de los seres humanos (Mestecky y McGhee, 1987; Hanson y Brandzaeg, 1989; Kerr, 1990; Brandtzaeg y Farstad, 1999; Corthésy y Spertini, 1999; Shikina y cols., 2004).

La mayoría de la SIgA en los mamíferos se deriva de la síntesis local por las células B, y no de la circulación, con lo cual se ha establecido claramente que el sistema inmunológico secretor está separado y es independiente de la inmunidad sistémica. La inducción de la producción local de IgA depende en gran medida de las células T cooperadoras 2 (T helper 2 - Th2 -) que producen citocinas que favorecen la respuesta de células B (Brandtzaeg y cols., 1999).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la interleucina 10 (IL-10), conjuntamente con la interleucina 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5) promueven la diferenciación de células B a células productoras de IgA (Kim y Kagnoff, 1990; Okahashi y cols., 1996). La mayoría de las células plasmáticas productoras de IgA tienen una vida media de 5 días, por lo tanto la migración y la maduración de las células B en tejido mucosal debe ser garantizado por día (Brandtzaeg y cols., 1999); además, la IL-6 parece jugar un papel crucial en la maduración de la IgA (Ramsay y cols., 1994).

Después de su síntesis, las moléculas de IgA polimérica se unen al pIgR en la cara basolateral de las células que conforman el epitelio de la mucosa y son transportadas a la superficie apical y la porción extracelular del pIgR, denominada componente secretor (SC), es fraccionado para la liberación de la SIgA en la luz (Mostov y cols., 1980; Brandtzaeg y Prydz, 1984; Mostov, 1994). Este mecanismo implica que las respuestas de Abs Ag-específicos pueden ser establecidas en la luz sin alterar la integridad de la barrera epitelial (Tomasi y cols., 1965; Stokes y cols., 1975; Conley y Delacroix, 1987). Además, las células epiteliales de la mucosa humana proporcionan una fuente de IL-6 para la maduración de los linfocitos B en células plasmáticas (figura 3) (Salvi y Holgate, 1999).

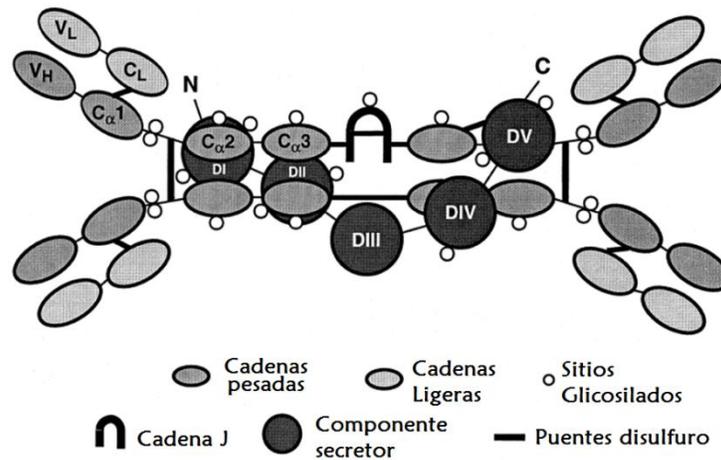
Curiosamente, ciertas citocinas como el IFN- $\gamma$  promueven el transporte de IgA a través del epitelio por la regulación a la alza en la expresión del pIgR (Youngman y cols., 1994). Parece pues, que la cooperación entre los linfocitos cercanos y las células epiteliales de la mucosa en el medio ambiente, es esencial para mejorar la función de IgA y la homeostasis de la respuesta inmunológica.



**Figura 3. Transcitosis de inmunoglobulina A polimérica (pIgA).** El receptor epitelial para pIgs, es sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso (RER) y glicosilado en el aparato de Golgi, es dirigido a la membrana basolateral donde puede unirse a su ligando (generalmente pIgA). El complejo pIgR/pIgA es endocitado en vesículas cubiertas. Mientras una significativa porción de pIgR es reciclado a la membrana de la célula (no se muestra en el esquema), aproximadamente el 30 % del pIgR es transcitado en condiciones básicas por un mecanismo microtubular y dependiente hacia vesículas apicales. El complejo pIgR/pIgA es soltado en la hendidura de la membrana apical en el lumen mucosal como SIgA, mientras el SC es liberado (Mostov, 1994).

Las características únicas de la SIgA, incluyendo su naturaleza polimérica, la resistencia a las enzimas proteolíticas, patrón de glicosilación y la unión a moco (Biesbrock y cols., 1991), contribuyen a la eficacia de los Abs de este isotipo en las secreciones nasales, saliva, calostro, leche materna y las lágrimas. La SIgA se compone de dos monómeros de IgA y dos cadenas de polipéptidos adicionales, la cadena J y SC. Los cuatro polipéptidos constituyentes se producen por dos tipos distintos de células. Las cadenas pesadas, las ligeras, y la J son sintetizadas y ensambladas por las células plasmáticas. El SC

corresponde a los cinco dominios extracelulares del pIgR y es aportado por las células epiteliales de las mucosas y las glándulas exocrinas (figura 4) (Dennis, 2008).



**Figura 4. Representación esquemática de un dímero de SIgA.** Dos monómeros de IgA son unidos en una conformación de cola a cola por la conexión de cadena J, mostrada con forma de U. El SC que viene del producto de la escisión del pIgR está representado como cinco esferas. Los principales puentes disulfuro implicados en el ensamble apropiado del complejo entero son representados como líneas gruesas. Otros rasgos incluyen los sitios glicosilados encontrados en varios polipéptidos que constituyen la proteína, cuya función es conferir estabilidad (Dennis, 2008).

En los mamíferos existen dos subclases del isotipo, IgA1 e IgA2. Las moléculas de IgA1 contienen un segmento de 13 aminoácidos, ausentes en la región de la bisagra de las moléculas IgA2, que se ha postulado puede conferirle mayor flexibilidad (Pumphrey, 1986). La presencia de esta secuencia extra en moléculas IgA1 es responsable de la sensibilidad de los Abs a las proteasas de bacterias específicas (Mestecky y Russell, 1986; Killian y Russell, 1994; Mattu y cols., 1998).

La función principal de la IgA es proporcionar una barrera inmunológica que excluya a los antígenos extraños, como bacterias, virus, parásitos y toxinas de las superficies mucosales (Lamm, 1997). La exclusión inmunológica impide la adherencia de los microorganismos a las células del epitelio luminal para así bloquear la invasión y la infección (Corthésy y Kraehenbuhl, 1999). En el caso de infecciones virales, los estudios *in vitro* con el virus de la influenza han establecido que la prevención de la agregación y penetración viral es un importante mecanismo por el cual la IgA neutraliza un virus (Taylor y Dimmock, 1985). Durante su paso por las células epiteliales de las membranas mucosas,

los Abs IgA pueden tener una oportunidad para neutralizar patógenos intracelulares y obligar a antígenos en la lámina propia a ser excretados a través del epitelio adyacente hacia la luz, con lo que libran al cuerpo de los complejos inmunológicos formados a nivel local y disminuyen su acceso a la circulación sistémica (Kaetzel y cols., 1991). Se piensa que la agregación, inmovilización y neutralización de patógenos en las superficies de la mucosa se ve facilitada por la polivalencia de la SIgA. Por lo tanto, las moléculas SIgA en secreciones exteriores muestran una mayor avidéz a los antígenos en comparación con monómeros de IgA (Kaetzel y cols., 1991; Mazanec y cols., 1992; Brandtzaeg, 1995). Por último, a nivel intestinal, los complejos inmunológicos atrapados en la capa de moco se eliminan mediante el movimiento peristáltico, mientras que a nivel respiratorio lo hace por un movimiento mucociliar.

Además de los pIgR necesarios para transcitosis en el epitelio, la IgA se une a receptores en muchas células mononucleares. El receptor Fc alfa (Fc $\alpha$ R) se expresa en eosinófilos, monocitos, macrófagos y neutrófilos (Monteiro y cols., 1990; Shen, 1992). Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han dirigido a la comprensión de la compleja estructura y función de los Fc $\alpha$ R sistémicos, donde destacan, la ocupación y agregación de los Fc $\alpha$ R por los Abs en monocitos que lleva a la liberación de citocinas pro-inflamatorias, el entrecruzamiento de los Fc $\alpha$ R por IgA desencadenan el NF $\kappa$ B y la liberación de quimiocinas por células mesangiales (Duque y cols., 1997), el Fc $\alpha$ R interactúa preferentemente con pequeños agregados de IgA que contiene de cinco a seis moléculas por agregado, mientras que el monómero o grandes agregados que contienen IgA se unen en menor medida (Reterink y cols., 1997), además, los Fc $\alpha$ R que carecen de la cadena gama protege a IgA de la degradación celular a través de endosomas tempranos y la membrana plasmática.

#### **1.4.2. Inmunoglobulina G (IgG)**

Además de IgAs, cantidades significativas de IgG también pueden ser secretadas en el lumen intestinal de humanos adultos y roedores. Se ha reportado que las secreciones nasales contienen 300 mg/mL de IgG (Hanson y Brandzaeg, 1980), y aproximadamente 800 mg/mL de IgG pueden ser detectados en el recto humano (Kozlowski y cols., 1997).

Se ha demostrado, además, que la IgG puede ser transportada a través de barreras epiteliales intactas, a través de la placenta en humanos y en intestino neonatal de los roedores y animales domésticos, para la transferencia pasiva de inmunidad de la madre al feto o neonato, respectivamente (Dickinson y cols., 1999; Baba y cols., 2000; Yoshida y cols., 2004). El receptor responsable de este transporte es el receptor Fc neonatal para IgG (FcRn). Niveles significativos de FcRn también se expresan constitutivamente en las células epiteliales durante toda la vida en el intestino humano, pulmón y riñón (Israel y cols., 1997; Dickinson y cols., 1999).

La identificación de la expresión de FcRn en numerosos tipos de células epiteliales en los seres humanos y en otros mamíferos durante la vida adulta, junto con el reconocimiento de que FcRn media el transporte bidireccional de IgG (de basolateral a apical así como de las superficies apicales a la basolateral) *in vitro* e *in vivo* a través de las barreras epiteliales, ha dirigido la atención a otras posibles funciones del FcRn en la inmunidad más allá de la transferencia pasiva de IgG y la protección del catabolismo de la IgG (Persson y cols., 1993; Dickinson y cols., 1999; Spiekermann, 2002; Claypool, 2004; Yoshida y cols., 2004).

En concreto, este transporte bidireccional de IgG confiere una singular capacidad de FcRn para recuperar Ags luminales como un complejo con IgG y depositarlos en la mucosa, donde los complejos Ag-IgG puede ser capturados por APC para su posterior presentación a las células T CD4<sup>+</sup> (Yoshida y cols., 2004).

La IgG está equilibrada entre los compartimientos intravasculares y extravasculares, proporcionando así una protección sistémica completa. Las cuatro subclases de IgG son muy homólogas en cuanto a su estructura, pero cada una de ellas tiene un perfil único de funciones efectoras; así, en la activación de la ruta clásica del complemento, los complejos formados con IgG1 e IgG3 son eficaces, con IgG2 son menos eficaces y con IgG4 son inactivos (Melchers, 2005).

Por otra parte, para la producción de células IgG<sup>+</sup> en la mucosa (que representan alrededor del 3 y el 20% de las células productoras de Ig en el tubo digestivo y los bronquios, respectivamente), el isotipo predominante es IgG1. En cuanto a células, son más

frecuentes las IgG3 que las células IgG2 en las vías aéreas superiores, en contraste con el intestino distal (Pilette y cols., 2001).

Aunque aún no ha sido descrito completamente, algunas de las funciones principales de IgG local podrían ser un control específico de la invasión a la mucosa por parte de los agentes patógenos, como complemento a la actividad local de SIgA, y de participar en la transcitosis subepitelial de complejos inmunológicos dependientes de IgA (Kaetzel y cols., 1991). Se puede imaginar la interacción de IgG e IgA poliméricas locales, el primer isotipo funcionando para neutralizar la partícula y el segundo accionando la transcitosis del complejo para su liberación final en el lumen. Más estudios serán necesarios para delimitar la importancia de IgG locales en la prevención de infecciones.

## **1.5. Inmunidad mediada por células**

### **1.5.1. Linfocitos T**

Son llamados así porque maduran en el órgano linfático primario llamado timo; estos tienen un receptor de célula T (TCR) unido a su membrana; dicho receptor es un heterodímero compuesto por cadenas  $\alpha$ - $\beta$  o  $\gamma$ - $\delta$  y es el responsable de que casi todas las células T solo reconozcan antígenos cuando una molécula MHC propia se los presenta en la membrana de una APC.

Todas las subpoblaciones de células T tienen relación con el complejo transductor de señal en la membrana (CD3), este es un complejo de 5 cadenas polipéptidas invariables que se relacionan para formar 3 dímeros; dichas poblaciones se diferencian por la presencia de otra molécula en su membrana, la cual puede ser CD4 o CD8. Estas moléculas funcionan como correceptores con base en sus capacidades para reconocer el complejo péptido-MHC y sus dominios extracelulares son los que se unen a las regiones conservadas de las MHC en las APC.

CD4 es una glicoproteína de membrana monomérica de 55 kDa con 4 dominios extracelulares similares a las inmunoglobulinas ( $D_1 - D_4$ ), además tiene una región transmembranal hidrófoba y una cola citoplásmica larga que alberga 3 residuos de serina y pueden fosforilarse; las células T que presentan esta CD4 solamente reconocen Ags unidos a MHC clase II. Por otro lado, CD8 es un heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  enlazado por puentes disulfuro

o un homodímero  $\alpha$ - $\alpha$ , el cual se une únicamente a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) por el contacto con los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de ésta. La expresión de alguna de estas moléculas, define dos subpoblaciones funcionales de los linfocitos T ya que las células T CD4<sup>+</sup> funcionan como linfocitos T cooperadores (Th) y las que son T CD8<sup>+</sup> son linfocitos T citotóxicos (Tc) (Goldsby y cols., 2004).

Las células Th se activan por el reconocimiento de un complejo Ag-MHC clase II en una APC, después de activarse, comienzan a dividirse y crear una clona de células efectoras, cada una específica para el mismo complejo Ag-MHC clase II. Estas células Th secretan varias citocinas, que juegan una función central en la activación de las células B, células T y otras células que participan en la reacción inmunitaria. Las células Tc se activan cuando interactúan con un complejo Ag-MHC clase I en la superficie de una célula propia alterada, en presencia de las citocinas apropiadas (Zuckermann., 1999). Esta activación, que tiene como resultado la proliferación, determina que la célula Tc se diferencie en una célula efectora llamada linfocito T citotóxico (LTC). En contraste con las células Th, casi todos secretan unas cuantas citocinas y adquieren la capacidad para reconocer y eliminar células propias alteradas (Harty y Badovinac, 2002; Abbas y cols., 2004).

### **1.5.2. Linfocitos gama delta**

En base a la expresión del receptor de células T, dos distintas poblaciones se han identificado y designado como células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (Lahn, 2000).

Las células T  $\gamma\delta$  representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un TCR compuesto por dos cadenas de glicoproteínas llamadas  $\gamma\delta$  (Holtmeier y Kabelitz, 2005). A diferencia de las células T  $\alpha\beta$ , que residen principalmente en los órganos linfoides secundarios y juegan un papel central en la respuesta inmunológica adaptativa, muchas células T  $\gamma\delta$  residen en las capas epiteliales de tejidos subyacentes a las superficies internas y externas del cuerpo, tales como la piel, epitelio intestinal, los pulmones, y la lengua, donde funcionan como una primera línea de defensa (Born y cols., 1999). Presentes en mayor cantidad durante la vida temprana y disminuyendo en adultos, este grupo de células T suele ser mucho menos común que las células T  $\alpha\beta$  en circulación (Haas y cols., 1993).

## Características y función de los linfocitos gama delta

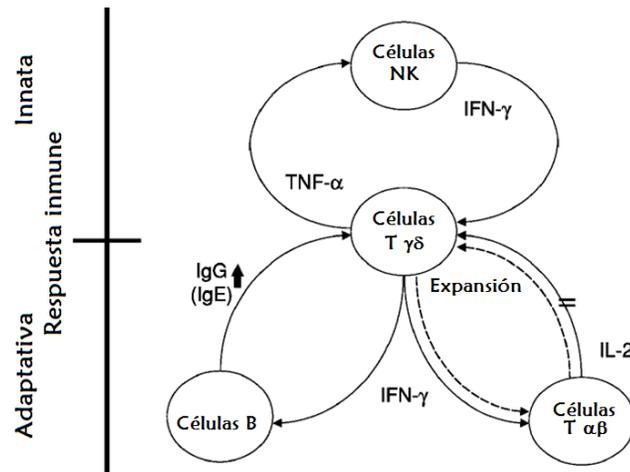
Las células T  $\gamma\delta$  se acumulan en los sitios de infección (por bacterias, virus, hongos) o inflamación crónica, son capaces de producir citocinas del perfil Th1 y Th2, tienen una rápida activación por citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF- $\alpha$ ), muestran una alta expresión de marcadores de memoria, su citotoxicidad no está restringida por MHC y mantienen una comunicación cruzada con otras células inmunológicas entre las que destacan las células asesinas naturales (NK) por parte de la inmunidad innata y las células B y T  $\alpha\beta$  en la inmunidad adaptativa.

Al principio, las células T  $\gamma\delta$  se comparaban con células NK, ya que comparten muchas funciones, tales como la capacidad de producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$  o el hecho de que algunas células expresan receptores de inhibición de células NK (KIR's) similares a los que se encuentran en células NK (Ferrick y cols., 1995).

Por otra parte, las células  $\gamma\delta$ , llevan en su superficie un conjunto de moléculas de superficie que comparten con las células T  $\alpha\beta$  (por ejemplo, CD2, CD3, CD7) y/o las células hematopoyéticas (por ejemplo, CD18, CD58). En los roedores y los seres humanos, correceptores CD4 o CD8 se encuentran en la gran mayoría de las células T  $\alpha\beta$  de los adultos, pero sólo en una pequeña fracción en las células T  $\gamma\delta$  derivadas de los sitios no epiteliales. Las células T  $\gamma\delta$  CD8+ son mucho más frecuentes en la sangre y el bazo del ganado y aves y en la mucosa intestinal de la mayoría de los animales. Sin embargo, a diferencia de las células T  $\alpha\beta$  CD8+, que por lo general expresan correceptor heterodimérico (es decir, compuesto de una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ ), la mayoría de las células T  $\gamma\delta$  expresan moléculas CD8+ homodiméricas “ $\alpha\alpha$ ” (Allison y Garboczi, 2002). Hay varias explicaciones para estas diferencias fenotípicas que se relacionan con las distintas características de desarrollo, la especificidad del Ag y el estado de activación de células T  $\alpha\beta$  y las  $\gamma\delta$ . En particular, la falta de ambos correceptores CD4 y CD8 en la mayoría de las células T  $\gamma\delta$  probablemente refleja su capacidad de reacción sin restricción al MHC.

En ausencia de células  $\gamma\delta$ , las células T CD4+ parecen producir más IL-2, y los linfocitos T CD8+ más actividad citotóxica, lo que indica que las células T  $\gamma\delta$  tienen un efecto moderador sobre la función de las células T  $\alpha\beta$ . Este efecto sobre el sistema

inmunológico adaptativo también incluye la regulación de las células B y su capacidad de producir inmunoglobulinas. Por ejemplo, en presencia de IL-4 las células T  $\gamma\delta$  estimulan el aumento en la producción de inmunoglobulina E (IgE), mientras que en ausencia de IL-4 las células T  $\gamma\delta$  solo apoyan la producción de IgG (figura 5) (Häcker y cols., 1995).



**Figura 5. Papel de las células T  $\gamma\delta$  en la respuesta inmunológica innata y adaptativa.** El TNF- $\alpha$  producido por las células T  $\gamma\delta$  mejora la producción de IFN- $\gamma$  en las células NK, que a su vez activa a las células T  $\gamma\delta$ . La "comunicación cruzada" entre células  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$ : las células T  $\gamma\delta$  pueden disminuir la IL-2 en células T  $\alpha\beta$  (líneas continuas) dada la producción de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, las células T  $\alpha\beta$  pueden contribuir a la expansión de las células T  $\gamma\delta$  (líneas discontinuas). Entre las células T  $\gamma\delta$  y las células B, el efecto parece ser aumentar la producción de IgG e IgE (Lahn, 2000).

Las respuestas de los linfocitos T  $\gamma\delta$  se han encontrado en numerosas enfermedades y los datos se acumulan para sugerir que la función principal de estas células es la regulación inmunológica y la protección de tejidos contra los efectos dañinos secundarios de la respuesta inmunológica (Born y cols., 1999). En consecuencia, el secuestro de las células T  $\gamma\delta$  en los tejidos epiteliales o mucosas podría ser explicado por una mayor necesidad de regulación inmunológica (Komano y cols., 1995). Las células T  $\gamma\delta$  del pulmón inducidas por una infección producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , por lo tanto, es posible que participen en la inducción de células T CD8+ en los pulmones durante el curso de la infección (Rogers y cols., 1991). También es posible que las células T  $\gamma\delta$  participen en la inducción de células T CD8 indirectamente a través de la activación de poblaciones, como los macrófagos (Nishimura y cols., 1995). Se ha informado que los macrófagos producen interleucina 12 (IL-12) ante la estimulación por el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que, a su vez, son producidos por las

células  $\gamma\delta$ . La IL-12, indirectamente inducida por las células T  $\gamma\delta$  podrá participar en la inducción de células T CD8+ (Lahn, 2000).

### **1.5.3. Linfocitos CD25**

Durante una respuesta inmunológica, la presentación y unión del Ag por el MHC, a una célula T por medio de su TCR estimula la secreción de interleucina-2 (IL-2) y al mismo tiempo, la expresión de receptores de IL-2 (IL-2R). Los receptores consisten en una subunidad alfa privada (CD25) y dos subunidades compartidas, beta (CD122) y gama (CD132). La heterodimerización de los dominios citoplasmáticos CD122 y CD132 son suficientes para la señalización de transducción (Nakamura y cols., 1994). La subsecuente interacción de IL-2 con IL-2R, estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células inmunológicas (Nakagawa y cols., 1988).

Actualmente se cree que el CD25 actúa sólo para generar el receptor de alta afinidad IL-2R, que consiste en el heterotrímero de las subunidades CD25/CD122/CD132, pero la falta de expresión de CD25 conduce a una disminución de las células T periféricas y la aparición de clonas autorreactivas (Roifman, 2000). Hoy en día la expresión de CD25 se encuentra asociada a la expresión del gen FoxP3, un marcador específico de células T reguladoras. Estas células modulan la autoinmunidad, inhibiendo a las células T autorreactivas que escapan al control del timo. Pueden diferenciarse en el propio timo, llamándose T reguladoras (Treg) naturales, o en la periferia, llamadas Treg adaptativas (Bluestone y Abbas, 2003).

Las células Treg naturales, a diferencia de las células T, que expresan CD25 transitoriamente después de la activación, mantienen la expresión de CD25 (Malek y cols., 2002), muy probablemente debido a la continua estimulación del TCR por antígenos propios en la llamada selección negativa (Seddon y Mason, 1999). Se consideran Treg naturales porque siempre están presentes en individuos normales y llevan a cabo su función de regulación durante el funcionamiento normal (Bach, 2003).

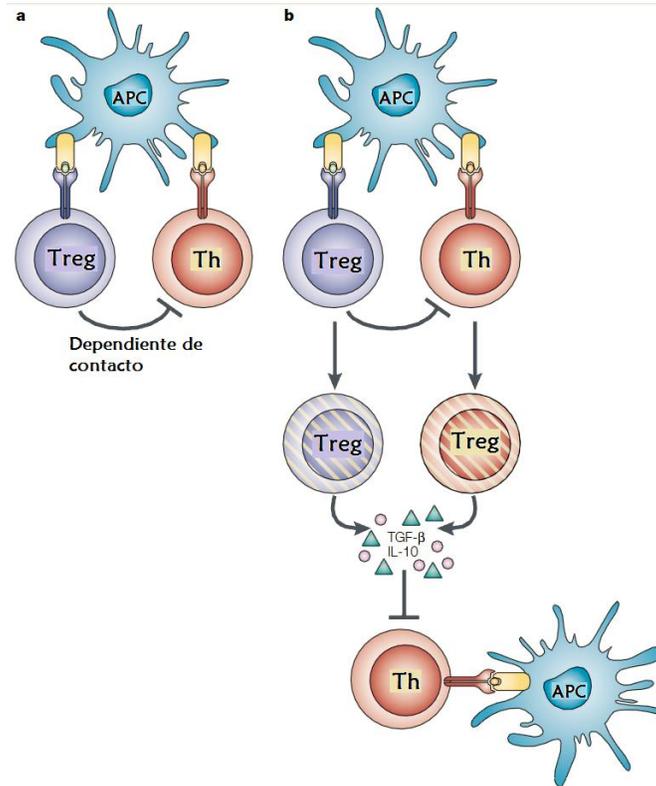
Por otro lado, existe un conjunto de células reguladoras que se generan a partir de poblaciones de células T maduras bajo ciertas condiciones de estimulación antigénica. Al igual que las células Treg naturales, las células Treg adaptativas se originan en el timo, pero

podieran derivarse de subconjuntos clásicos de células T o las células Treg naturales. El nivel de expresión de CD25 en las células Treg de adaptación es variable, dependiendo de la enfermedad y el sitio donde se hayan requerido. La función de las células Treg adaptativas *in vivo* es dependiente de citocinas (Maloy y Powrie, 2001). Por lo tanto, se propone que las células Treg adaptativas se diferencian de las células Treg naturales no por su origen (el timo), sino más bien por su exigencia de una mayor diferenciación en consecuencia de la exposición al Ag en un contexto inmunológico distinto.

Las Treg adaptativas median sus actividades inhibitorias con la producción de citocinas inmunosupresoras, como el TGF- $\beta$  e IL-10 (Nakamura y cols., 2001). Por el contrario, las células Treg naturales, al menos *in vitro*, funcionan por un mecanismo independiente de citocinas, que presumiblemente implica interacciones. Este mecanismo de supresión dependiente de contacto se ha demostrado más convincentemente en las células CD4+CD25+ naturales (figura 6) (Nakamura y cols., 2001).

En resumen, se considera que la función principal de las células Treg naturales es evitar la respuesta inmunológica contra antígenos propios. Por el contrario, se sugiere que el subconjunto de células Treg adaptativas tiene la función principal de mantener el control homeostático sobre diversas respuestas inmunológicas, y puede o no ser un participante crucial en el mantenimiento de la auto-tolerancia.

Existe conocimiento de una población de células CD8+CD25+ con actividad reguladora en el timo post-natal. Estas células comparten localización, fenotipo, funciones y mecanismos de acción con las células Treg CD4+CD25+ (Annunziato y cols., 2002; Bluestone y Abbas, 2003).



**Figura 6. Dos clases de células T reguladoras.** a) En este modelo hipotético, las células Treg naturales (morado) suprimen la respuesta inmunológica de una manera dependiente del contacto y su función es en la homeostasis general para bloquear las acciones de las células T autoinmunes (rojo) en situaciones no inflamatorias. b) El subconjunto de células Treg adaptativas aumenta la robustez de la supresión de una respuesta mediante producción de IL-10 y TGF- $\beta$ . Es importante destacar que estas células Treg pueden desarrollarse a partir de cualquier célula Treg CD4+CD25+ natural (rayas moradas) o mediante la alteración de la actividad de los linfocitos T cooperadores (Th) (rayas rojas) (Bluestone y Abbas, 2003).

### 1.6. Limitaciones del sistema inmunológico para responder en edades tempranas

Históricamente, el sistema inmunológico neonatal se ha considerado inmaduro para la generación de respuestas inmunológicas y en su lugar originar tolerancia (Eskola y Käyhty, 1998). Los estudios realizados han mostrado que la proliferación de linfocitos T neonatales con Concanavalina A (ConA), tanto en infantes pretérmino y término, son significativamente bajas comparadas con niños y adultos (Gasparoni y cols., 2003). Más estudios han reportado diferencias fenotípicas significativas entre las células T del neonato y adulto, sugiriendo la reducción de la respuesta inmunológica mediada por células, aunque existen reportes que han documentado que las células T del neonato, aunque inexpertas, pueden aumentar competentemente la respuesta inmunológica bajo estímulos apropiados

(Chipeta y cols., 2000). También, respuestas del tipo Th1 mediada por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son bajas en el neonato (una reducida producción de IL-12 por mononucleares y DC podría ser la razón) (Rondini y Chirico, 1999; Marodi, 2002), incluso la reducción en la expresión del ligando de CD40 (CD40-L) por las células T neonatales podría contribuir al retraso en la diferenciación de células T inexpertas en células Th1 efectoras (Lewis, 2004). El porcentaje de IL-2 producido por células T CD4+ como CD8+, en recién nacidos, es alto, mientras que el porcentaje de IL-4 producido por células T CD8+ es alto comparado con el bajo porcentaje producido por las células T CD4+ (Gasparoni y cols., 2003). En conjunto, los linfocitos T neonatales son menos capaces de llevar a cabo respuestas Th1 e inclinarse hacia respuestas Th2, dada una importante deficiencia de IFN- $\gamma$  lo que sugiere que las respuestas tipo Th1 estén más comprometidas en neonatos y que progresivamente maduren con la edad (Vigano y cols., 1999; Adkins y cols., 2001).

Por otra parte, se han descrito varias diferencias en el fenotipo de células B neonatales (tabla 1), como incremento de CD10 presente en células inmaduras y CD38 (ADPc ribosa hidrolasa) que funciona como un segundo mensajero en las vías de señalización, reducción de CD21, lo que limita su capacidad para responder a complejos polisacárido-complemento (Timens y cols., 1989), CD32 que siendo un receptor de baja afinidad para Fc de la IgG regula a la baja la producción de este isotipo cuando los niveles son altos, moléculas de adhesión y moléculas del MHC-II (Lewis y Tu, 2004). Además, las respuestas de las células B en la vida temprana son influenciadas por numerosos factores intrínsecos, ejemplo de ello son los Abs de origen materno que se unen a los Ags de las vacunas y por consiguiente, evitan que las células B sean estimuladas eficientemente (Siegrist, 2003).

**Tabla 1.** Limitaciones intrínsecas y extrínsecas de los linfocitos B de los neonatos (Siegrist y Aspinall, 2009).

TIPO DE CÉLULAS O SITIO	CARACTERÍSTICAS EN NEONATOS
Células B inexpertas	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Expresión disminuida de receptores celulares de superficie (CD21, CD40, CD80 y CD86).</li> </ul>
Células plasmáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Respuestas de IgG limitadas a Ags proteicos en edades menores a 12 meses.</li> <li>➤ Respuestas limitadas de IgG a la mayor parte de Ags polisacáridos en edades entre 18 y 24 meses.</li> <li>➤ Limitada persistencia de Abs.</li> </ul>
Células B de memoria	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Preparación eficaz de las células B de memoria incluso antes del nacimiento.</li> <li>➤ Progresiva diversificación del repertorio de IgG.</li> <li>➤ Maduración de afinidad limitada en edades menores a 4-6 meses.</li> </ul>
Centros germinales	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Respuestas de GC inmaduras*.</li> <li>➤ Funcionalidad limitada de la red FDC*.</li> </ul>
Médula ósea	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Acceso limitado a lugares de células plasmáticas*.</li> </ul>

\*observado en ratones.

La inmadurez de linfocitos T – B y APC (en particular los reducidos niveles en la expresión de HLA-DR, CD1a, CD40, CD80, ICAM-1 e IL-12) son los responsables de la marcada deficiencia de la producción de Abs en el neonato. De hecho, el cambio de isotipo, conocido como *switch*, de IgM a otros isotipos está retrasado (Splawski y cols., 1991).

En conclusión, la respuesta citotóxica reducida, la pobre proliferación de células T, la inmadurez de los linfocitos T y B, la inadecuada síntesis de citocinas, la marcada deficiencia en la producción de Abs y la reducida actividad de neutrófilos, complemento y células NK, son factores contribuyentes a la deficiente función inmunológica del neonato. Sin embargo, a pesar de que la vacunación neonatal no suele dar lugar a una rápida respuesta de Abs, puede resultar eficaz para la sensibilización inmunológica, que puede actuar como base para futuras respuestas (Belloni y cols., 2003). Por lo tanto, se cree que al

evaluar la respuesta inmunológica ante la inmunización perinatal, ésta incrementará directamente con la edad de vacunación.

### **1.7. Protocolos de inmunización**

La vacunación oral y nasal ha demostrado ser eficaz para inducir respuestas inmunológicas en mucosas, ya que estas rutas de inmunización se encargan de estimular a las células inmunocompetentes en los sitios inductivos en la mucosa (Staats y cols., 1994). Varios autores han demostrado que la inmunización vía oral o intranasal (IN) con una variedad de Ags, en combinación con adyuvantes, como los liposomas y la subunidad B de la toxina del cólera, aumenta el número de células secretoras de Abs (ASC) en el sitio de aplicación (Abraham, 1992; Ogawa y cols., 1992; Wilson y cols., 1993). Incluso se ha logrado demostrar que las inmunizaciones mucosales inducen la migración de células linfoides entre los distintos tejidos del MALT y varias glándulas de excreción, donde estas células proliferan y se diferencian a células efectoras (McGhee y cols., 1992; Pickery Butcher, 1992), produciendo un marcado aumento de la SIgA Ag-específica, observada en secreciones a distancia, incluyendo la saliva, las lágrimas, los lavados bronquiales y gastrointestinales (Bergmann y Waldman, 1988; Czerkinsky y cols., 1991; Forrest y cols., 1991). Esta comunicación entre los diferentes tejidos de las mucosas constituye la base de las estrategias de inmunización (Kraehenbuhl y Neutra, 1992).

Una vacuna ideal debe producir respuesta inmunológica de protección a largo plazo frente a un patógeno. Esta respuesta incluye los Abs, que neutralizan a los microorganismos invasores, y los linfocitos T citotóxicos, que destruyen patógenos intracelulares. Dado que la mayoría de las bacterias y los virus inician las infecciones en las superficies de la mucosa donde la SIgA juega un papel importante en la prevención de la colonización, las vacunas que estimulan la inmunidad secretora contra los patógenos representan una ventaja alternativa a la inmunización parenteral clásica (Siegrist, 2001).

El uso de un protocolo de inmunización por vía SubC en combinación con la vía IN ha sido probada (Alvarado, 2011) como fuente de nuevas estrategias de vacunación que induzcan respuestas inmunológicas en la mucosa de cerdos. Los resultados mostraron una buena respuesta inmunológica tanto a nivel sistémico como en secreciones (Alvarado., 2011). Esta combinación de vías de inmunización ha sido empleada en un experimento

previo de inmunización perinatal, realizado sobre cerdos convencionales de 3, 10 y 14 días de edad, mostrando que las respuestas tanto de IgA como IgG específica son inducidas en los tres grupos de animales; pero es mayor en los animales de 14 días (Zenteno, 2011). En estos proyectos se ha empleado la proteína OVA como un Ag modelo que ha permitido visualizar el comportamiento del sistema inmunológico ante este protocolo de inmunización, a futuro se pretende emplear Ags de mayor interés clínico.

### **1.8. Modelo experimental**

Las especies que habitan el planeta se han diversificado, muy probablemente a partir de un origen compartido. Como sucede en toda familia de gran tamaño, hay distintos grados de cercanía entre los miembros, desde hermanos y primos con gran empatía entre sí, hasta antecesores lejanos, casi desconocidos. En el caso del humano hay similitudes manifiestas con los primates, con quienes guarda una relación directa; algunos otros vínculos comienzan a ser más tratados gracias a la cercanía que se tiene, como es el caso del cerdo, especie con la que tenemos un estrecha relación biológica (Roppa, 2008).

Dicha proximidad ha resultado de gran valor científico ya que muchos conocimientos generados en torno al cerdo son aplicables en el hombre. El cerdo, "es un modelo animal muy noble porque podemos estudiar enfermedades propias de esta especie" en analogía con padecimientos del humano, ya que sus órganos y funcionamiento interno son similares, así como su sistema inmunológico (Sinkora y Butler, 2009).

El estudio de las enfermedades se lleva de manera muy semejante en ambas especies, muchos Ags y Abs se pueden estudiar de la misma manera (Butler y cols., 2008). Es un modelo animal que ha permitido la investigación en xenotransplantes, sobre todo de corazón, riñón e hígado (Butler y Marek, 2007).

Como se ha descrito, el cerdo es un excelente modelo que proporciona información sobre el desarrollo del sistema inmunológico; su edad y maduración después del nacimiento es equiparable a la del humano, siendo así un modelo idóneo para el estudio de la inmunidad perinatal, misma que por cuestiones técnicas y éticas no se puede realizar directamente en el humano. (Chick y cols., 1938, Peltonen y cols., 1984, Birchall y cols., 2002).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La capacidad de respuesta del sistema inmunológico cambia con la edad en una gran parte de los mamíferos, incluidos el humano; se ha observado que en el periodo neonatal, las infecciones son, una causa importante de morbilidad y mortalidad; lo cual parece indicar que los neonatos son incapaces de desarrollar respuestas inmunológicas eficaces durante la etapa de los retos inmunológicos primarios, contribuyendo a que sea más susceptible a las infecciones.

La vacunación genera un notable impacto sobre la morbilidad y mortalidad en este tipo de población, aun cuando se cuenta con basta información de la respuesta inmunológica, se carece de información sobre la edad óptima de inmunización perinatal para inducir una respuesta inmunológica en las mucosas. Así, en un modelo de minicerdo vietnamita, se analizó la respuesta sistémica y mucosal contra el Ag modelo OVA; con el fin de tener datos que ayuden a diseñar protocolos de inmunización perinatal efectivos

### **3. HIPÓTESIS**

La respuesta inmunológica sistémica y mucosal de cerdos lactantes, ante la inmunización perinatal, será proporcionalmente más alta según su edad de maduración.

### **4. OBJETIVOS**

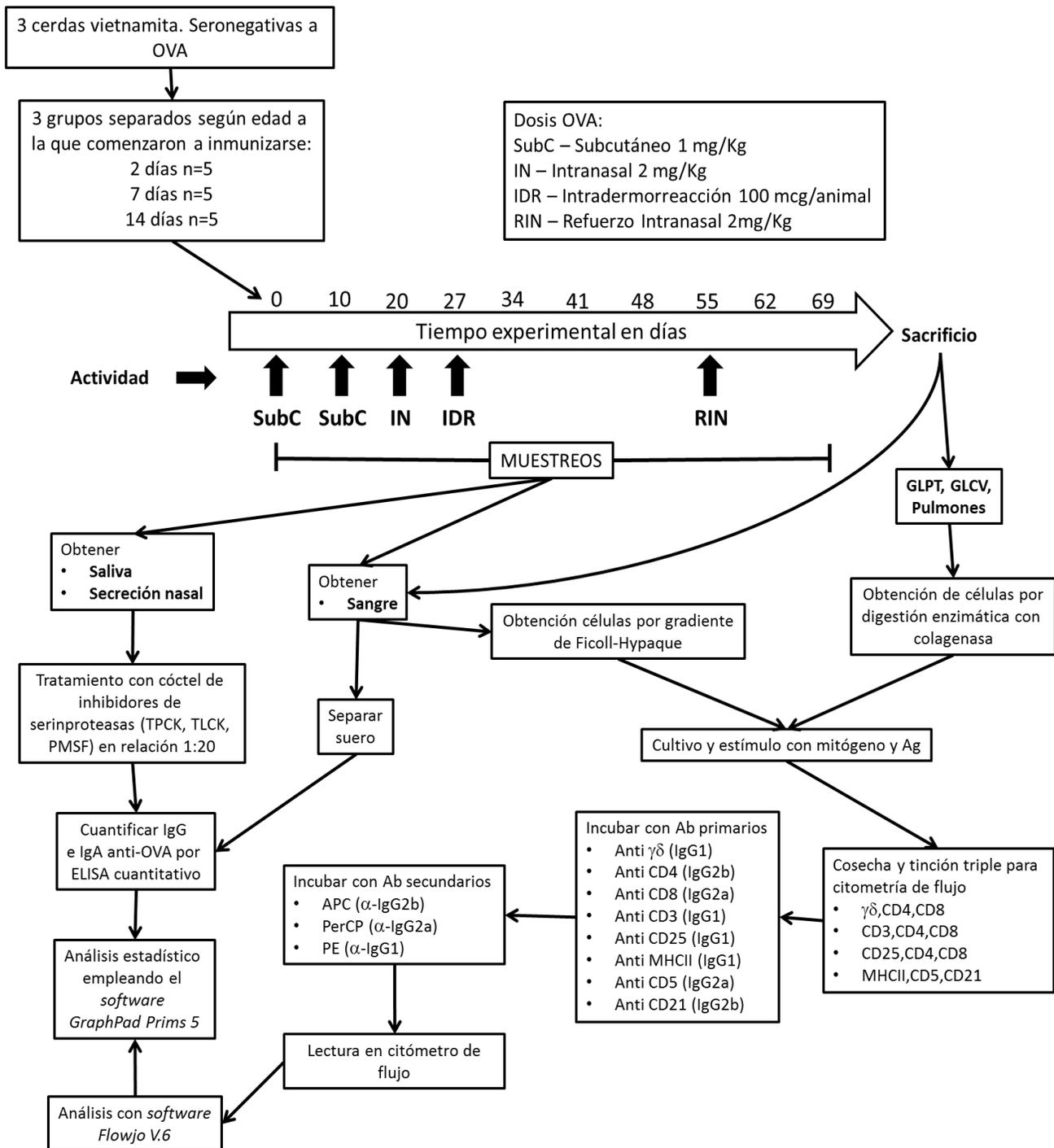
#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta inmunológica sistémica y mucosal específica contra OVA, en cerdos vietnamita inmunizados perinatalmente.

#### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la cinética de la respuesta inmunológica sérica y mucosal de IgG e IgA anti OVA mediante ELISA cuantitativo tras la inmunización perinatal de minicerdos vietnamita.
- Evaluar, una vez terminado el análisis de la cinética de Abs (3 meses de edad del cerdo), diversas subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre, ganglio y pulmón, mediante citometría de flujo.
- Estimar, para este protocolo y antígeno, la edad óptima de inmunización perinatal para obtener una respuesta inmunológica en mucosas.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



**Figura 7. Metodología experimental.** Los grupos conformados por cinco animales se formaron en función de la edad a la que comenzarían a inmunizarse siguiendo el protocolo (SubC/SubC/IN) en intervalos de 10 días y realizando la toma de muestra cada 7 días hasta cumplir tres meses. OVA = ovoalbúmina. GLPT = ganglio linfático peritraqueal. GLCV = ganglio linfático cervical. APC = alofocianina. PerCP = proteína clorofila peridina. PE = ficoeritrina. TPCK = N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona. TLCK = clorhidrato de Na-tosyl-L-lisina clorometil cetona. PMSF = fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. ANIMALES**

Se emplearon 15 lechones de minicerdo vietnamita, libres de patógenos específicos (SPF), que provenían de madres seronegativas a OVA, procedentes de una piara criada, cuidada y vigilada en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), siguiendo las normas aprobadas por el Comité interno (CICUAL) y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Se formaron 3 grupos de 5 cerdos cada uno, distinguiéndose por la edad de inmunización (2, 7 y 14 días de edad).

Los cerdos se destetaron a los 35 días de edad y se alimentaron únicamente de LACTOCERDINA PT (Nestlé Purina Pet Care Company), dándoles diariamente aproximadamente 800 g por animal. Los grupos se llevaron hasta los 3 meses de edad, cuando se sacrificaron.

### **6.2. ANTÍGENO**

Para las inmunizaciones se empleó un Ag modelo, la OVA (albúmina de huevo fracción V, SIGMA), la cual se administró a una concentración de 1 mg/mL y a una dosis de 1 mg/kg (vía SubC) y 2 mg/kg (vía IN) de peso en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), se esterilizó utilizando filtros estériles de 0.22 micras (CORNING). Para la administración SubC se adicionó un adyuvante oleoso (GIBCO<sup>®</sup>, VET-L07) en relación 1:20, se agitó vigorosamente previo a su aplicación.

### **6.3. INMUNIZACIÓN Y TOMA DE MUESTRA**

#### **6.3.1. INMUNIZACIÓN**

Se inmunizó a los cerdos de acuerdo a la edad del grupo al que pertenecían (2, 7 y 14 días), se aplicaron 3 inoculaciones siguiendo el protocolo: SubC, SubC, IN, dando una separación de 10 días entre ellas; se realizó un refuerzo vía IN 2 semanas previas al sacrificio. Para la vía subcutánea, se utilizó la OVA a la dosis de 1 mg/kg de peso, se aplicó detrás de la oreja derecha del animal con jeringa de 1 mL y aguja de calibre 27Gx1/2". En la vía IN, la OVA se aplicó a dosis de 2 mg/kg de peso y sin adyuvante, en las fosas nasales

utilizando un atomizador. Se aplicó una intradermorreacción (IDR) a dosis total de 100 µg de OVA entre la primera y la segunda teta del animal del lado izquierdo y, de igual modo, del lado derecho se inocularon 100 µL de PBS estéril como control, se revisó durante los 3 días posteriores (formación de eritema e induración en la zona de inoculación).

### **6.3.2. MUESTREO**

Al realizar las 3 inmunizaciones se muestreó a los animales, posteriormente se realizaron 7 muestreos más con intervalos de 7 días entre ellos, en los 10 muestreos se obtuvo sangre mediante venopunción yugular, utilizando tubos Vacutainer sin anticoagulante de 10 mL (Becton Dickinson Company); además se obtuvo muestra de saliva y secreción nasal, para esto se cargaba al animal con el fin de no estresarlo y con ayuda de hisopos nuevos se frotó durante varias veces la boca o nariz, evitando lastimar y/o sangrar al animal con lo cual se contaminarían las muestras; esto se hacía con 2 o 3 hisopos hasta obtener una cantidad suficiente de muestra ( $\pm 150$  µL), finalmente los hisopos eran cortados y colocados en tubos Eppendorf de 1.5 mL, los cuales eran rotulados y mantenidos a 4 °C.

## **6.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA**

### **6.4.1. SANGRE**

El tubo se llevó a la incubadora para mantenerlo a 37 °C durante 30 minutos para favorecer la formación del coágulo, pasado el tiempo se centrifugó a 550 xg durante 15 minutos; con ayuda de una micropipeta (Pipetman p1000 GILSON) se retiró el suero (parte superior) y se almacenó a -20 °C en alícuotas de 1 mL correctamente rotulada. Los coágulos fueron desechados en un contenedor de residuos biológicos.

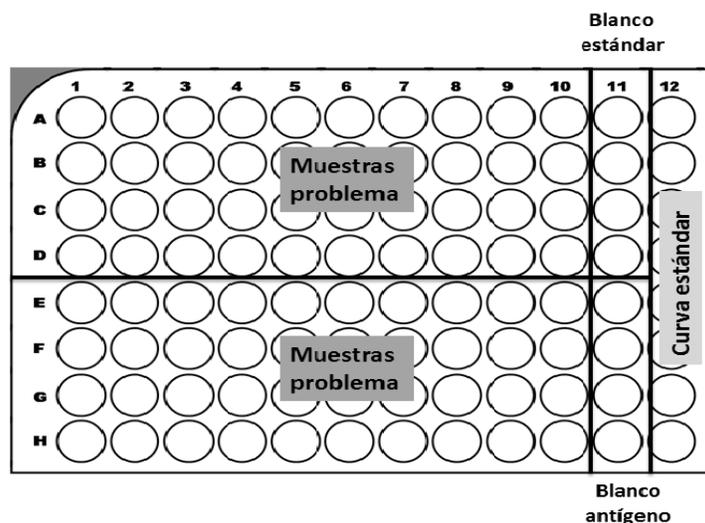
### **6.4.2. SALIVA Y SECRECIÓN NASAL**

Los tubos Eppendorf con los hisopos fueron centrifugados 5 minutos a 15000 xg a 4°C y la muestra obtenida se retiró con micropipeta, llevándola a otro tubo limpio. Con la finalidad de evitar la degradación de las inmunoglobulinas se aplicaron inhibidores de serinproteasas, un coctel que incluía TPCK (*N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*, SIGMA), TLCK (*Na-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride*, SIGMA) y

PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, SIGMA); dicho coctel fue preparado en relación 1:1:1, a partir de *stock* de concentraciones de 5 mg/mL, 2.5 mg/mL y 17.4 mg/mL respectivamente y fue empleado en una relación 1:20 para la muestra. Una vez adicionados los inhibidores, se almacenó la muestra a -20°C perfectamente rotulada hasta su uso.

### 6.5. ELISA CUANTITATIVA PARA IgG

Se utilizaron placas nuevas de poliestireno de 96 pozos (*Costar*<sup>®</sup> *CORNING* 3595) con fondo en U para facilitar la homogenización de los reactivos, las cuales primeramente se sensibilizaron con OVA en amortiguador de carbonatos (0.05 M carbonato-bicarbonato, pH 9.6), a una concentración de 2 µg/mL. Se colocaron 100 µL por pozo (en los pozos correspondientes a las muestras y sus respectivos blancos). Se tapó la placa y se dejó a 4 °C 12 Hr (figura 8). Pasado este tiempo se colocaron en los pozos correspondientes de la curva estándar y a su blanco 100 µL del Ab de captura (*Goat anti-Pig IgG affinity purified* Bethyl Laboratories Inc.) en amortiguador de carbonatos y se incubó 1 Hr a temperatura ambiente.



**Figura 8.** Diagrama del patrón de llenado de la placa de ELISA. Se muestra la ubicación de los blancos, la curva estándar y las muestras problema dentro de la placa de ELISA cuantitativa para IgG e IgA.

Posteriormente se realizaron tres lavados con solución de lavado (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 8.0), se retiró el exceso de solución de lavado y se colocaron en todos los pozos 150  $\mu$ L de solución de bloqueo (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0), se dejó incubando en agitación suave 1 Hr a 37 °C en un agitador (Daigger modelo 22406A). Después de la incubación se realizaron tres lavados con la solución de lavado y se retiró el exceso de solución para colocar el suero de referencia porcino (*Pig reference serum*, Bethyl Laboratories Inc.) según las instrucciones del fabricante para la curva estándar. Para las muestras, en la primer columna, se colocó la muestra en dilución 1/50 para los sueros y 1/5 para las mucosas, en amortiguador de dilución y de esta se realizaron 3 diluciones, triples seriadas para los sueros y dobles seriadas para las mucosas, al final cada pozo contenía 100  $\mu$ L.

En los pozos correspondientes a los blancos del estándar y blancos del Ag se colocaron 100  $\mu$ L del amortiguador de dilución y se dejó incubando a las mismas condiciones. Pasada la Hr se realizaron 5 lavados para retirar la muestra y el suero de referencia, y se eliminó el exceso de solución. Se aplicó el Ab secundario conjugado con HRP (*Goat anti-pig-HRP conjugate*, Bethyl Laboratories Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante, en amortiguador de dilución y se colocaron 100  $\mu$ L en todos los pozos de la placa, se dejó incubando 1 Hr a 37 °C con agitación suave.

Se lavó 3 veces con solución de lavado y después se eliminó el exceso. Se preparó la solución de sustrato utilizando 1 mL de TMB (1 mg TMB/mL DMSO) en 10 mL de amortiguador de citratos (0.1 M citrato-cítrico, pH 5.0) y 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Se colocaron 100  $\mu$ L del sustrato en todos los pozos y se mantuvo en reposo y sin luz, hasta observar el cambio de coloración (incolore-azul); cuando el tono se tornó más intenso, se llevó al lector de ELISA (Multiskan EX 100-120V, Thermo Electron Corporation) para leerlo a 650 nm, una vez que el punto más concentrado de la curva arrojó una lectura entre 0.7 - 0.8 de absorbancia, se paró la reacción adicionando 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y con esto se observó un cambio de color (azul-amarillo). La placa se llevó de nuevo al lector, se agitó y se leyó a 450 nm.

Con los valores de concentración conocida y sus respectivas absorbancias netas se construyó una gráfica de absorbancia vs concentración, donde se interpolaron los valores problema que se multiplicaron por el factor de dilución y se obtuvo la concentración final de las mismas.

## **6.6. ELISA CUANTITATIVA PARA IgA**

Se sensibilizaron placas nuevas de poliestireno de 96 pozos con OVA en amortiguador de carbonatos de la misma manera que para IgG y se colocó el Ab de captura (*Goat anti-Pig IgA affinity purified* Bethyl Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubó 1 Hr a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-Tween (PBS 0.05% Tween 20, pH 7.4), se eliminó el exceso de solución y se colocaron en todos los pozos 150  $\mu$ L de PBS-Tween para bloquear, se dejó incubando en agitación suave 1 Hr a 37 °C. Después de la incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween y se retiró el exceso de solución para colocar la curva estándar (*Pig reference serum*, Bethyl Laboratories Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la primer fila, se colocó la muestra (suero o mucosas) en dilución 1/5 en PBS-Tween 20 y de ésta se realizaron 3 diluciones dobles seriadas en los pozos subsecuentes, al final cada pozo contenía 100  $\mu$ L.

En los pozos correspondientes a los blancos de estándar y blancos del Ag se colocaron 100  $\mu$ L de PBS-Tween y se dejó incubar a las mismas condiciones. Pasada 1 Hr se realizaron 5 lavados con PBS-Tween y se eliminó el exceso de solución. Se usó un Ab anti-IgA de cerdo en PBS-Tween (*Mouse Anti-Porcine*, Serotec) y se incubó 1 Hr a 37 °C con agitación suave. Se lavó 3 veces con PBS-Tween y después se quitó el exceso de solución. Se aplicó un Ab biotinilado (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Biotin Conjugate*, ZyMax <sup>TM</sup>) en PBS-Tween y se incubaron 1 Hr a 37 °C con agitación suave. Se lavó 3 veces con PBS-Tween y se retiró el exceso de solución. Se aplicó estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (*Alkaline Phosphatase-conjugated Streptavidin*, Jackson ImmunoResearch) y se incubó 1 Hr a 37 °C con agitación suave. Al término de la incubación se lavó 3 veces y se agregaron 100  $\mu$ L del sustrato de p-nitrofenil fosfato

(PNPP, Sigma®), 45 minutos después, se realizó la lectura en el lector de ELISA. Los cálculos se realizaron de la misma forma que para IgG.

## **6.7. SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS**

### **6.7.1. SACRIFICIO**

Se realizó un refuerzo IN (RIN) al día 55 post-inmunización y cuando los cerdos tenían aproximadamente 3 meses de edad se comenzaron a sacrificar; primero se tranquilizó al animal utilizando 2 mg/kg de azaperona por vía intramuscular (IM) profunda (Sural®, Productos Farmacéuticos S.A. de C.V.), posteriormente se administraron 0.6 mg/kg de clorhidrato de tiletamina y 0.6 mg/kg de clorhidrato de zolazepam vía intravenosa (IV) (Zoetil® 50, Virbac S.A.). Se tomó muestra de sangre mediante una venopunción yugular, utilizando tubos Vacutainer de 10 mL con heparina, los cuales se agitaron para mezclar con el anticoagulante; posteriormente el cerdo fue lavado con jabón y desinfectado con yodo (Isodine espumoso) en la zona de corte, se colgó de las extremidades traseras y se desangró mediante incisiones en las venas axilares. Una vez desangrado por completo, el animal fue lavado y secado para la necropsia.

### **6.7.2. OBTENCIÓN DE ÓRGANOS**

El animal se colocó sobre la mesa de trabajo limpia y desinfectada y se abrió el tórax cortando los cartílagos esterno-costales, dejando expuesto el corazón junto con el tracto respiratorio. Se ligaron tanto las venas y arterias periféricas a corazón como la tráquea y se extrajeron junto con los pulmones, éstos se colocaron en un recipiente estéril con tapa a 4 °C. Los ganglios linfáticos se obtuvieron de la región cervical y peritraqueal y de igual modo se mantuvieron dentro de una caja Petri estéril a 4 °C.

## **6.8. OBTENCIÓN DE CÉLULAS**

### **6.8.1 SANGRE**

Se colocó la sangre recolectada en un tubo cónico estéril de 50 mL y se diluyó 1/2 con PBS 1X estéril. En tubos cónicos estériles de 15 mL, se agregaron 2 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) más 10 mL de la sangre diluida, ésta se adicionó lentamente por las

paredes del tubo para evitar que se mezclara con el Ficoll; se centrifugó a 450 xg por 30 minutos, pasado el tiempo se observaron 4 fases en el tubo (eritrocitos/ Ficoll /células blancas/sobrenadante), las células blancas, fueron retiradas con pipeta Pasteur y llevadas a un tubo cónico estéril de 50 mL y se centrifugaron a 350 xg por 15 minutos. Después se eliminaron eritrocitos con el amortiguador de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.14 M,  $\text{KHCO}_3$  1 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0) y se lavó con PBS cuantas veces fue necesario hasta obtener únicamente el paquete celular limpio, el cual fue resuspendido en 3 mL de medio RPMI-1640 incompleto (HEPES modificado, SIGMA-ALDRICH Inc.), estas células se mantuvieron a 4 °C hasta su uso en el cultivo (aproximadamente 1 Hr).

### **6.8.2. GANGLIO**

Se realizó un *pool* con los diversos ganglios obtenidos, a los cuales se les retiró todo el tejido graso hasta quedar completamente limpios y posteriormente fueron macerados, esto realizando cortes con bisturí y tijeras curvas hasta obtener pequeños fragmentos del tejido.

### **6.8.3. PULMÓN**

Se trabajó dentro de la campana de flujo laminar donde se retiró el tejido que se encontraba de más; después se realizó un lavado con solución salina fisiológica (SSF) estéril para eliminar la sangre a través de la arteria pulmonar y con una jeringa de 60 mL se pasaron aproximadamente 2 L de SSF. Se realizó un lavado bronquio alveolar (LBA), con 100 mL de PBS estéril, se tuvo especial cuidado de recuperar la mayor cantidad de PBS posible. Este lavado se colocó en un tubo cónico de 50 mL estéril, se centrifugó a 450 xg por 5 minutos y 1 mL de sobrenadante se alicuotó y mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Se realizó un *pool* con los diversos lóbulos (apical, medio y diafragmático de cada lado), esto tomando la porción media superior de cada uno de ellos, siempre y cuando no se encontrara lastimado (petequias y/o necrosis), utilizando material de disección estéril (bisturí, pinzas y tijeras) se les retiró el árbol bronquial, cuidando de no mezclar el parénquima con el tejido epitelial, una vez limpios fueron macerados.

Del macerado de ganglio se pesaron entre 3-5 g y de pulmón aproximadamente se tomaron 30 g, estos se colocaron en pequeños matraces Erlenmeyer de teflón de 50 mL estériles, adicionando colagenasa estéril tipo IV (150 U/mL) (Worthington Biochemical Corporation). Éstos se colocaron a 37 °C durante 1 Hr en agitación continua. Pasado el tiempo, se filtró el parénquima hacia un tubo cónico de 50 mL con organza estéril en la boca y el filtrado obtenido se centrifugó a 450 xg durante 5 min, después se eliminaron eritrocitos con el amortiguador de lisis y se lavó con PBS cuantas veces fue necesario hasta obtener únicamente el paquete de células limpio, el cual fue resuspendido en 3 mL de medio RPMI incompleto, estas células se mantuvieron a 4 °C hasta su uso en el cultivo (aproximadamente 1 Hr).

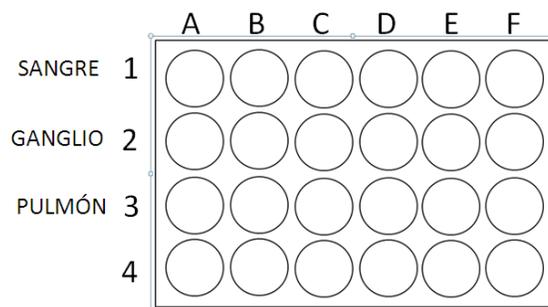
**Nota:** Todos los procedimientos para obtención de células fueron realizados bajo condiciones estériles empleando una campana de flujo laminar.

## **6.9. CONTEO CELULAR**

Se realizó en el contador automático Countess™ (*Automated cell counter* de Invitrogen™), en donde se colocó la mezcla de 10 µL de la muestra con 10 µL del colorante Azul de Tripano. Se determinó la viabilidad, número de células vivas, muertas y el número total de células.

## **6.10. CULTIVO CELULAR**

Se separaron 50 millones de células de cada tejido y se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se separó y la pastilla celular fue lavada con PBS estéril y resuspendida en 400 µL de medio frío RPMI completo. Se distribuyeron en placas estériles de poliestireno de 24 pozos de fondo plano (Costar® CORNING), colocando 100 µL de la solución anterior, donde al final cada pozo quedó con 10 millones de células; las cuales se cultivaron en 2 mL de medio RPMI completo más un volumen de Ag; el volumen final fue variable (figura 9).



**Figura 9. Diagrama del patrón de llenado de la placa de fondo plano para cultivo.** Se muestra la ubicación de las células de los diversos tejidos.

Línea A y E = Controles (100  $\mu$ L de células + 2 mL medio RPMI completo frío)

Línea B= 100  $\mu$ L de células + 20  $\mu$ L de ConA [5  $\mu$ g/mL] + 2 mL medio RPMI completo frío.

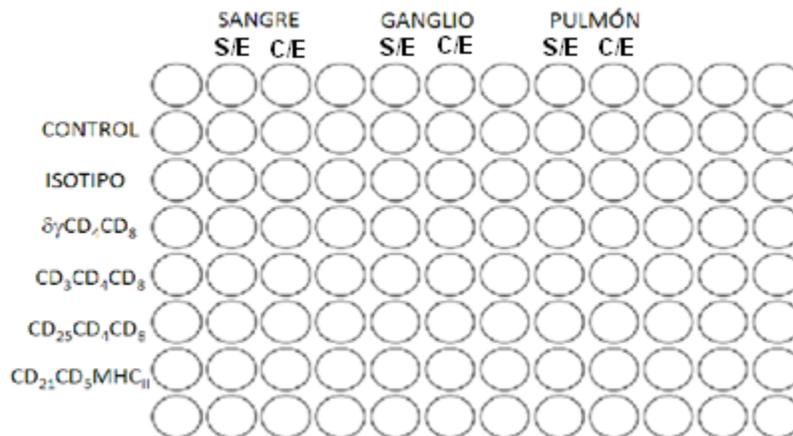
Línea F= 100  $\mu$ L de células + 32  $\mu$ L de OVA [1000  $\mu$ g/mL] + 2 mL medio RPMI completo frío.

La placa se incubó a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 días para el caso de las células + ConA y durante 7 días para el caso de células + OVA; dándoles a estas últimas 2 reestímulos de Ag a los 3 y 5 días de incubación.

## 6.11. MARCAJE Y LECTURA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

### 6.11.1 MARCAJE

Se resuspendieron levemente las células del cultivo y se pasaron 250  $\mu$ L (en los cuales aproximadamente estaban 1.25 millones de células) a cada pozo de las placas de poliestireno de 96 pozos con fondo en U (Costar<sup>®</sup> CORNING) esto con la finalidad de realizar tinciones triples y con ello identificar las diversas subpoblaciones de linfocitos T y B, se colocó un control de células sin teñir y un control de isotipo (figura 10).



**Figura 10. Diagrama del patrón de llenado de la placa para tinción de citometría.** Se muestra la ubicación de las células con y sin estímulo de los diversos tejidos, además de las subpoblaciones celulares a identificar. S/E = células sin estímulo. C/E = células estimuladas.

Una vez llenas las placas, se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se retiró (evitando remover el botón de células del fondo), las células fueron resuspendidas, se agregaron 200  $\mu$ L por pozo de solución A (solución amortiguadora de fosfatos con suero normal de cerdo) y se incubaron a temperatura ambiente durante media Hr. Pasado dicho tiempo, se centrifugó a las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se agregaron 10  $\mu$ L de Ab primario (tabla 2) a los pozos correspondientes, mientras que al control se adicionaron 10  $\mu$ L de solución A y al isotipo 10  $\mu$ L del isotipo en solución; esto se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, después se lavó 2 veces con 150  $\mu$ L de solución A centrifugando a las mismas condiciones; se agregaron 10  $\mu$ L de la mezcla de Abs secundarios conjugados con los fluorocromos específicos contra los isotipos de los Abs primarios (tabla 3) a los pozos correspondientes así como al isotipo; mientras al control se le puso nuevamente solución A, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y en obscuridad. Pasada la incubación, se lavaron 2 veces, la primera con 150  $\mu$ L de solución A y la segunda con 150  $\mu$ L de PBS, centrifugando a las mismas condiciones. Finalmente se fijaron con 150  $\mu$ L de p-formaldehído al 1 %, se resuspendieron y se pasaron a tubos Falcon® (BECTON DICKINSON).

**Tabla 2.** Abs primarios contra marcadores celulares para citometría de flujo.

ANTICUERPO ANTI-	ISOTIPO	CLONA	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Control de isotipo	Mouse isotipo	08-6599	1/100	VMRD
CD3	IgG1	8E6	1/10	VMRD
CD4	IgG2b	MCA1749	1/10	Serotec
CD8	IgG2a	MIL-12	1/5	Donación, Universidad de Bristol, Inglaterra
CD25	IgG2a	K23L-3B2	1/10	Donación, Universidad de Bristol, Inglaterra
$\gamma\delta$	IgG1	PGBL22A	1/20	VMRD
CD21	IgG2b	CC51	1/5	Donación, Universidad de Bristol, Inglaterra
CD5	IgG2a	MCA2307	1/10	Serotec
MHCII	IgG1	MA1335	1/10	VMRD

**Tabla 3.** Abs secundarios conjugados con fluorocromos

ANTICUERPOS ANTI-	FLUOROCROMO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
$\alpha$ -IgG1	PE	1/40	Jackson ImmunoResearch.
$\alpha$ -IgG2a	PerCP	1/30	Jackson ImmunoResearch.
$\alpha$ -IgG2b	APC	1/30	Jackson ImmunoResearch.

### 6.11.2. LECTURA

Se leyeron en el citómetro de flujo FACScalibur (BECKTON DICKINSON), capturando 20,000 eventos (1 evento = 1 célula) de cada muestra; en la siguiente tabla 4, se muestran los parámetros utilizados.

**Tabla 4.** Longitudes de onda y canales para cada fluorocromo

FLUOROCROMOS	ANTICUERPOS ANTI-	LONGITUD DE EXCITACIÓN	LONGITUD DE EMISIÓN	CANAL
<b>R-PE</b>	IgG1	488 nm	575 nm	FL-2
<b>PerCP</b>	IgG2a	468 nm	675 nm	FL-3
<b>APC</b>	IgG2b	600-650 nm	660 nm	FL-4

### 6.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el caso de Abs, se ordenaron los datos por grupo y fechas de muestreo y se promediaron; con el *software GraphPad Prism 5.0* se realizó el gráfico que muestra la cinética de concentraciones de Abs durante el experimento y con la prueba *t de Student* se establecieron diferencias significativas entre grupos.

Para los datos de fenotipos celulares, de los cuales únicamente se reportó la frecuencia parcial en porcentaje, es decir, que el valor trabajado fue el obtenido en los cuadrantes finales y no fue multiplicado por el porcentaje encontrado en la población antecesora (es por ello que los valores de los cuatro cuadrantes de cada población al ser sumados no dan un total de 100%). Esos datos fueron agrupados (estimulados y sin estimular respectivamente), promediados, graficados y analizados estadísticamente con *t de Student* para obtener las diferencias significativas en el *software GraphPad Prism 5.0*.

## 7. RESULTADOS

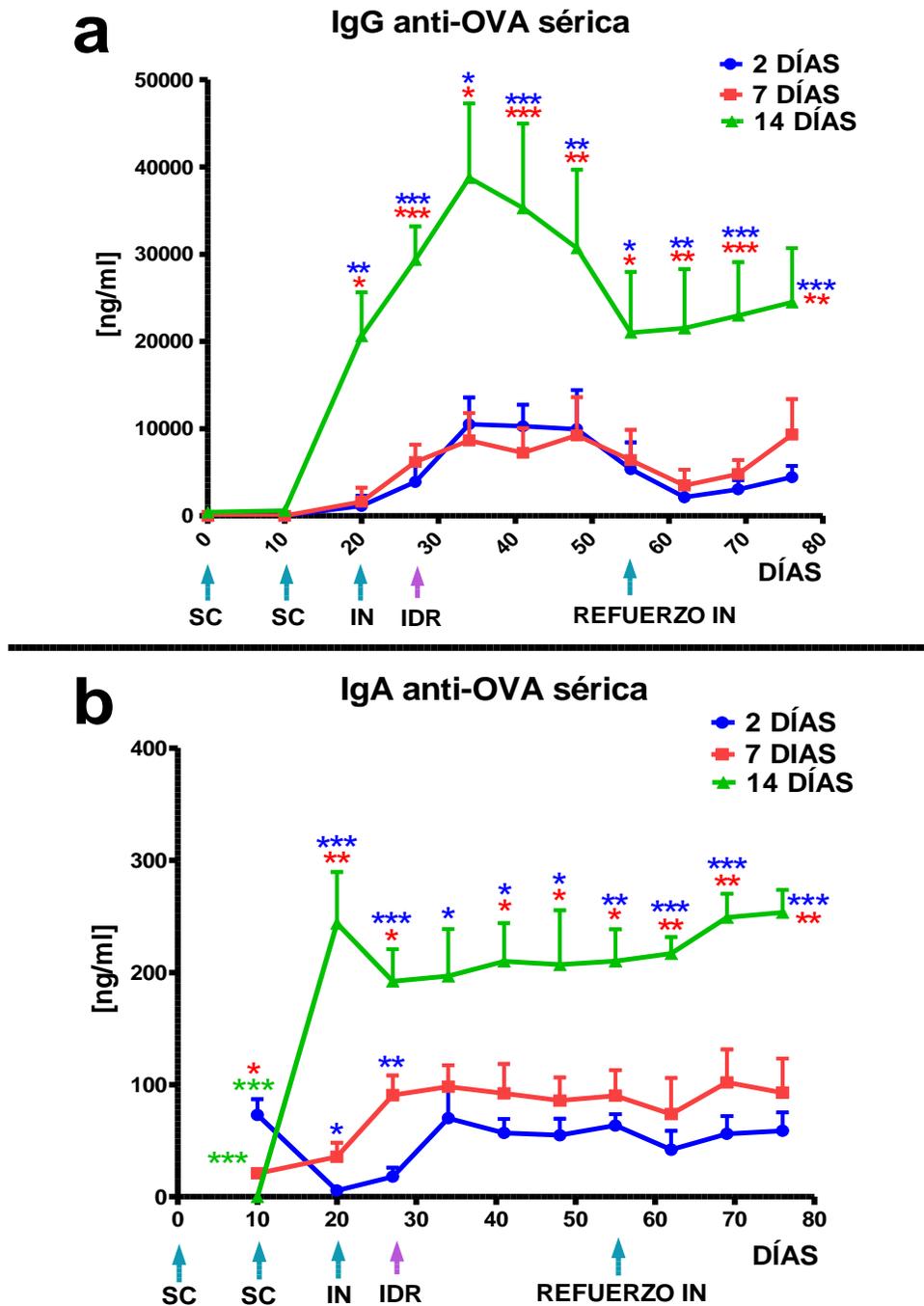
### 7.1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL

Para realizar el análisis en suero y secreciones mucosales, se obtuvieron muestras de los días en que se aplicó la inmunización y después cada semana durante 76 días. La cuantificación de inmunoglobulinas en suero y mucosas fue realizada con la técnica de ELISA cuantitativa; los valores obtenidos se agruparon por día y edad de inmunización, se obtuvieron los promedios y el error estándar de la media (SEM) con el *software GraphPad Prims 5*, y se aplicó la prueba estadística *t de Student* para comparar la respuesta inmunológica entre las diversas edades de inmunización.

### 7.1.1. Respuesta sérica de IgG e IgA contra OVA

Al realizar el análisis de las concentraciones séricas de IgG anti OVA de los grupos experimentales; se encontró que el grupo inmunizado a mayor edad (14 días) tuvo mayores concentraciones de IgG anti OVA en comparación con los inmunizados a 2 y 7 días. El grupo de 14 días tuvo concentraciones más altas que el grupo de 7 días en los días 20, 34 y 55 post-inoculación ( $P<0.05$ ); en los días 48, 62 y sacrificio ( $P<0.01$ ) y finalmente, en los días 27, 41 y 69 ( $P<0.001$ ). Al compararlo con el grupo de 2 días, mostró concentraciones más altas en los días 34 y 55 ( $P<0.05$ ); en los días 20, 48 y 62 ( $P<0.01$ ); finalmente en los días 27, 41, 69 y sacrificio ( $P<0.001$ ). La comparación entre los grupos de 2 y 7 días no mostró diferencias significativas (figura 11a).

Las concentraciones séricas de IgA anti OVA del grupo inmunizado a mayor edad (14 días) fueron mayores en comparación con los inmunizados a los 2 y 7 días. Contrastado con el grupo de 7 días, se encontraron concentraciones más altas en los días 27, 41, 48 y 55 ( $P<0.05$ ) post-inoculación; en los días 20, 62, 69 y sacrificio ( $P<0.01$ ). Respecto al grupo de 2 días en los días 34, 41 y 48 ( $P<0.05$ ); en los días 20, 62, 69 y sacrificio ( $P<0.01$ ). Mientras que el grupo de 7 días mostró concentraciones elevadas respecto al de 14 días para el día 10 ( $P<0.001$ ); mismo que también mostró concentraciones más altas que el grupo de 2 días en el día 20 ( $P<0.05$ ) y 27 ( $P<0.01$ ). El grupo de 2 días mostró concentraciones elevadas en ciertos puntos respecto a los grupos de 7 y 14 días; para el caso de 2 respecto al de 7 días se mostró en el día 10 ( $P<0.05$ ) y para la misma fecha contra el grupo de 14 días mostró concentraciones elevadas ( $P<0.001$ ) (figura 11b).

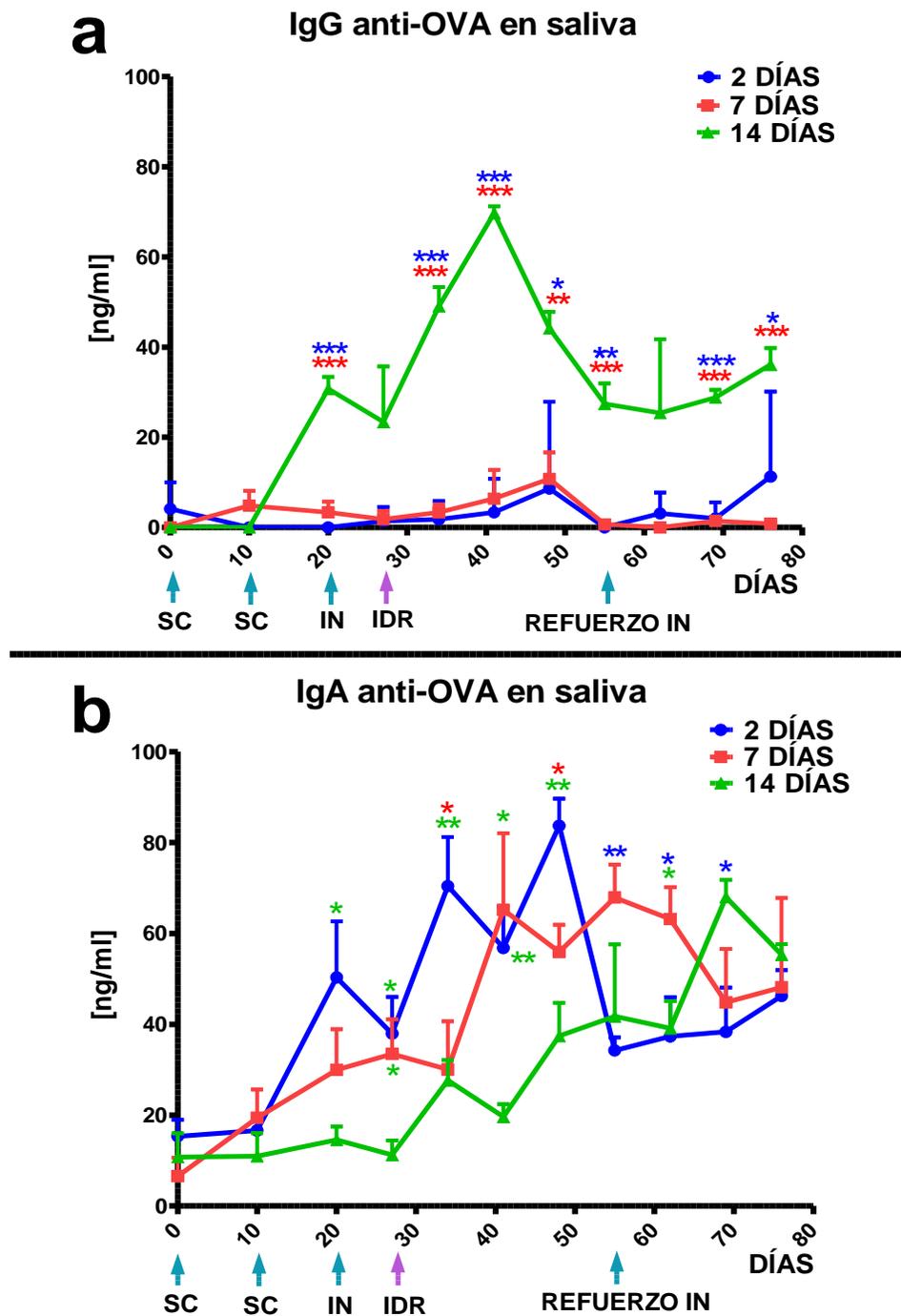


**Figura 11. Concentración sérica de IgG (a) e IgA (b) [ng/mL] anti OVA en cerdos inmunizados a diferentes edades.** Los animales se distribuyeron en tres grupos: 2, 7 y 14 días de edad, representados en color azul, rojo y verde respectivamente. Fueron inmunizados en tres ocasiones (flechas azules) y posteriormente se les realizó una prueba de IDR (flecha morada) para evaluar la respuesta celular. Se aplicó un RIN al día 55 y se sacrificaron 2 semanas después. Cada punto representa el promedio de cinco animales  $\pm$  el SEM, con diferentes escalas en la ordenada al origen. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . Prueba *t* de Student. IgG = Inmunoglobulina G. OVA = Ovoalbúmina. SubC = subcutánea. IN = Intranasal. IDR = Intradermorreacción.

### 7.1.3. Respuesta de IgG e IgA contra OVA en saliva

En las concentraciones de IgG existió una diferencia significativa en la respuesta inmunológica de los animales del grupo de 14 días con relación a los inmunizados a los 2 y 7 días. Hubo diferencias con ambos grupos para el día 20 (fecha en que se aplicó la inmunización IN), así como para los días 34, 41, 55, 69 y 76 ( $P < 0.001$ ), también al día 48 ( $P < 0.01$ ), mientras que en el resto de las fechas no hubo diferencia significativa. La comparación contra el grupo de 2 días tuvo un comportamiento semejante, para los días 20, 34, 41 y 69 ( $P < 0.001$ ), el día 55 ( $P < 0.01$ ) y los días 48 y 76 ( $P < 0.05$ ). No hubo diferencia significativa entre los grupos de 7 y 2 días (figura 12a).

Al analizar los valores de las concentraciones de IgA OVA-específica en saliva, se encontró que existió una respuesta temprana y alta del grupo de 2 días por encima de los grupos de 7 y 14 días (figura 12b), mostrando diferencia estadística contra el grupo de 7 días en los días 34 y 48 ( $P < 0.05$ ). Con el grupo de 14 días, se observó diferencia para los días 34, 41 y 48 ( $P < 0.01$ ) y en los días de la aplicación IN (día 20) y la IDR (día 27) ( $P < 0.05$ ). El grupo de 7 días generó una diferencia significativa con el grupo de 2 días para el día 55 ( $P < 0.01$ ) y 62 ( $P < 0.05$ ), mientras que con el grupo de 14 días lo hizo para el día 69 ( $P < 0.05$ ). La comparación entre los grupos de 7 y 14 días, mostró que el primero expresó diferencias significativamente mas altas en el muestreo del día 27, 41 y 62 ( $P < 0.05$ ).

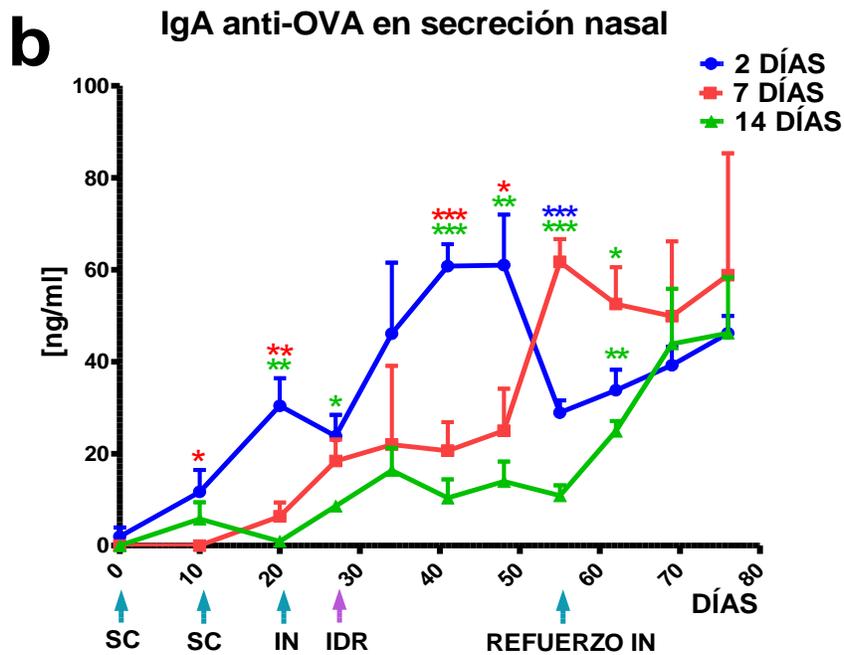
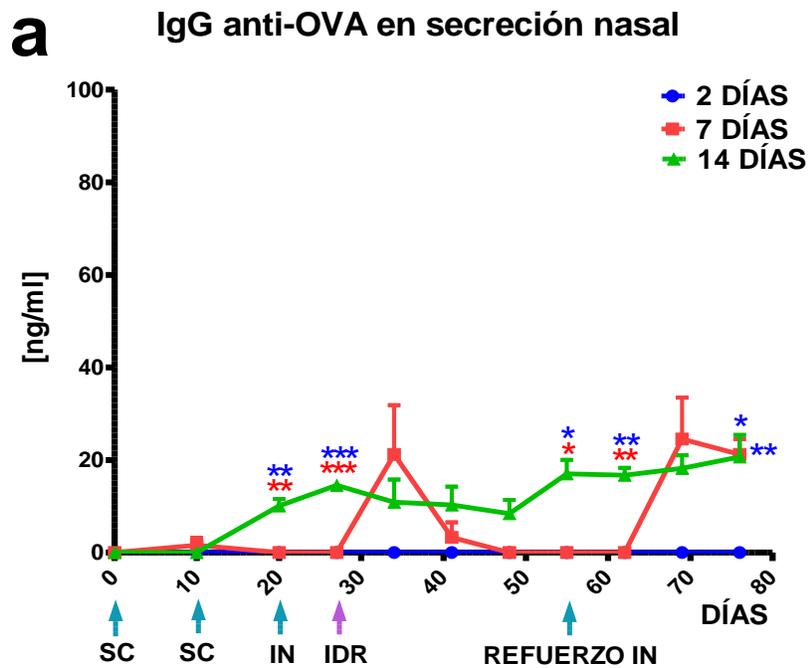


**Figura 12. Concentración de IgG (a) e IgA (b) [ng/mL] anti OVA en saliva de cerdos inmunizados a diferentes edades.** Los animales se distribuyeron en tres grupos: 2, 7 y 14 días de edad, representados en color azul, rojo y verde respectivamente. Fueron inmunizados en tres ocasiones (flechas azules) y posteriormente se les realizó una prueba de IDR (flecha morada) para evaluar la respuesta celular. Se aplicó un RIN al día 55 y se sacrificaron 2 semanas después. Cada punto representa el promedio de cinco animales  $\pm$  el SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . Prueba *t* de Student. IgG = Inmunoglobulina G. OVA = Ovoalbúmina. SubC = subcutánea. IN = Intranasal. IDR = Intradermorreacción.

### **7.1.5. Respuesta de IgG e IgA contra OVA en secreción nasal**

La respuesta de IgG del grupo de 14 días se encontró por encima de los otros dos grupos, el grupo de 7 días mostró una respuesta irregular y el de 2 días no respondió. El grupo de 14 días tuvo diferencias significativas contra los otros dos grupos los días 20 y 62 ( $P<0.01$ ), 27 y 76 ( $P<0.001$ ) y el día 55 ( $P<0.05$ ). A partir del día 69, el grupo de 7 días respondió y la diferencia significativa solo fue con el de 2 días ( $P<0.01$ ) (figura 13a).

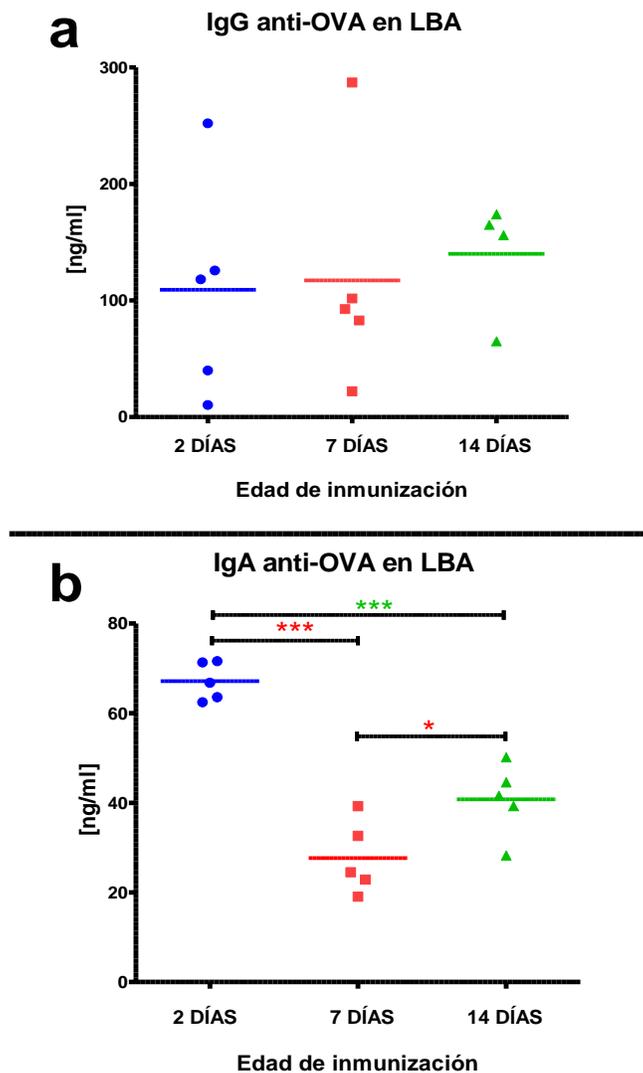
En el caso de IgA, nuevamente el grupo de 2 días respondió más rápido y alto que los otros grupos, con diferencias significativas contra el de 7 días al día 10 y 48 ( $P<0.05$ ), 20 ( $P<0.01$ ) y 41 (0.001). Las diferencias con el grupo de 14 días se presentaron los días 20 y 48 ( $P<0.01$ ), 27 ( $P<0.05$ ) y 41 ( $P<0.001$ ). Al día 55 hubo una caída importante de la concentración de IgA en el grupo de 2 días y las diferencias se establecieron con el grupo de 7 días que elevó su respuesta significativamente el día 55 ( $P<0.001$ ) y con el de 14 días que continuó bajo al día 62 ( $P<0.01$ ). A partir del día 62 el grupo de 7 días mantuvo diferencia con el de 14 ( $P<0.05$ ) para después igualarse a los demás grupos hasta el final del experimento (figura 13b).



**Figura 13. Concentración de IgG (a) e IgA (b) [ng/mL] anti OVA en secreción nasal de cerdos inmunizados a diferentes edades.** Los animales se distribuyeron en tres grupos: 2, 7 y 14 días de edad, representados en color azul, rojo y verde respectivamente. Fueron inmunizados en tres ocasiones (flechas azules) y posteriormente se les realizó una prueba de IDR (flecha morada) para evaluar la respuesta celular. Se aplicó un RIN al día 55 y se sacrificaron 2 semanas después. Cada punto representa el promedio de cinco animales  $\pm$  el SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . Prueba *t* de Student. IgG = Inmunoglobulina G. OVA = Ovoalbúmina. SubC = subcutánea. IN = Intranasal. IDR = Intradermorreacción.

### 7.1.7. Respuesta de IgG e IgA contra OVA en LBA

La concentración de IgG en el LBA, no mostró diferencia significativa en ninguno de los grupos (figura 14a). Sin embargo, las concentraciones de IgA en el LBA obtenido al sacrificio mostraron que el grupo de 2 días tuvo más IgA que los grupos de 7 y 14 días ( $P<0.001$ ), mientras que el grupo 14 días mostró mayor concentración que el de 7 días ( $P<0.05$ ) (figura 14b).

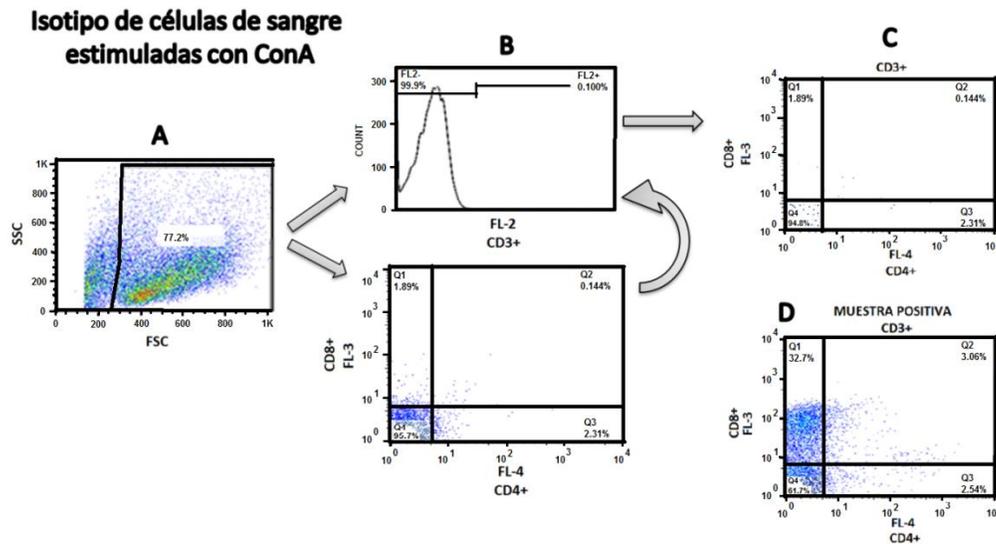


**Figura 14.** Concentración de IgG (a) e IgA (b) [ng/mL] anti OVA en LBA de cerdos de 3 meses de edad que fueron inmunizados a diferentes edades. Los animales se distribuyeron en tres grupos: 2, 7 y 14 días de edad (en azul, rojo y verde respectivamente), fueron sacrificados a los 76 días para obtener el LBA. La línea horizontal representa el promedio del grupo, con diferente escala en la ordenada al origen. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  y \*\*\* $P<0.001$ . Prueba *t* de Student.

## 7.2. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES

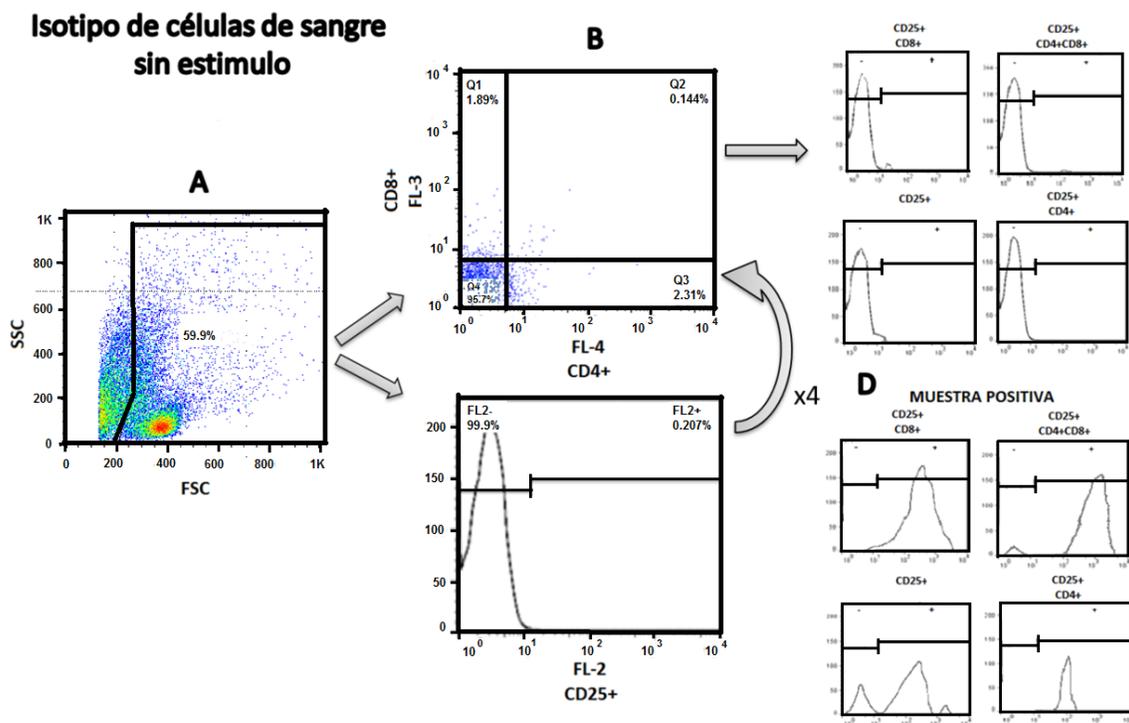
### 7.2.1 ANÁLISIS DE DATOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Se muestra un ejemplo representativo del análisis de poblaciones celulares, para el caso de linfocitos CD3 (figura 15), primero, en un gráfico de puntos (*dot-plot*) de tamaño contra granularidad del control de isotipo (figura 15-A) se tomó la región de mononucleares, la cual debía representar las tendencias de las células de los 10 cultivos (5 sin estimular y 5 estimulados) y de dicha ventana, mediante un histograma, se fijó la población positiva al marcador CD3, de la misma ventana de mononucleares se marcaron los cuadrantes con los marcadores CD4CD8 (figura 15-B); estos cuadrantes son los que se aplicaron sobre la población CD3+ en las células teñidas, obteniendo así, para el marcador CD3 los porcentajes de células CD3+CD4+ , CD3+CD8+, CD3+CD4+CD8+ (dobles positivas –DP-) y CD3+CD4-CD8- (dobles negativas –DN-) (figura 15-C). Este análisis se aplicó para la determinación de los linfocitos B, obteniendo los porcentajes de células CD21+CD5+, CD21+MHCII+, CD21+CD5+MHCII+ (DP) y CD21+CD5-MHCII- (DN); esto haciendo uso del *software FlowJo 7.6.1*.



**Figura 15.** *Determinación de poblaciones de linfocitos CD3 en el control de isotipo de células de sangre estimuladas.* Se muestran *dot-plots* e histogramas representativos para el análisis de la población CD3CD4CD8. En el *dot-plot* de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se tomó la región de mononucleares (A), después se generó el histograma donde se marcó la región positiva al marcador analizado (CD3) y de ahí mismo el *dot-plot* en donde se analizó la expresión de CD8 y CD4 (B), estos últimos cuadrantes se pasaron a la zona positiva del histograma para obtener así los porcentajes basales (C). Este análisis (cuadrantes) se aplicó a las muestras con tinción para obtener los porcentajes pertenecientes a cada subpoblación (D).

Para el caso de los linfocitos CD25 y  $\gamma\delta$ , el análisis se realizó de distinta forma a la anterior, por lo que se muestra un ejemplo representativo donde se analiza la población C25CD4CD8 (figura 16). Se determinó dentro del isotipo la ventana de los mononucleares, ajustando de tal forma que en ella entraran las células de los 10 cultivos (5 sin estimular y 5 estimulados) (figura 16-A); en esta ventana se marcó, con un histograma, la población positiva a CD25 en cuyo caso representa menos del 1% por tratarse del isotipo, y de la misma ventana se marcaron los cuadrantes CD4 y CD8 (figura 16-B), por último a cada uno de dichos cuadrantes se les sobrepuso la parte positiva del histograma para obtener así porcentajes de células CD25+CD4+, CD25+CD8+, CD25+CD4+CD8+ (DP) y CD25+CD4-CD8- (DN) (figura 16-C). Este análisis también se aplicó para los linfocitos  $\gamma\delta$ , obteniendo los porcentajes de células  $\gamma\delta$ +CD4+,  $\gamma\delta$ +CD8+,  $\gamma\delta$ +CD4+CD8+ (DP) y  $\gamma\delta$ +CD4-CD8- (DN); esto haciendo uso del *software FlowJo 7.6.1*.



**Figura 16. Determinación de las poblaciones de linfocitos CD25 en el control de isotipo de células de sangre sin estímulo.** Se muestran *dot-plots* e histogramas representativos para el análisis de la subpoblación CD25CD4CD8. En el *dot-plot* de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se tomó solo la región de mononucleares (A), después se generó el *dot-plot* en donde se analizó la expresión de CD4 y CD8 y de ahí mismo el histograma donde se marcó la región positiva al marcador analizado CD25 (B), luego a cada cuadrante se le pasó la región positiva del histograma, obteniendo así los porcentajes basales (C). Este análisis (cuadrantes) se aplicó a las muestras con tinción para obtener los porcentajes pertenecientes a cada subpoblación (D).

### 7.2.2. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T y B de tejidos porcinos

Cuando los cerdos cumplieron 3 meses de edad, fueron sacrificados y se obtuvieron tejidos de los cuales se separaron células; éstas fueron cultivadas y estimuladas con 20  $\mu\text{L}$  de ConA [5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] ó 32  $\mu\text{L}$  de OVA [1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], se incubaron durante 4 y 7 días respectivamente; aplicando a las últimas, 2 reestímulos de OVA a los 3 y 5 días para asegurar la activación celular. Pasado el tiempo de cultivo, se verificó por medio del microscopio invertido la ausencia de contaminación y el estado de las células, tanto sin estimular como estimuladas, en ello se encontró que el estímulo con ConA generó un cambio morfológico en relación a las células sin estímulo, incrementando en tamaño y formando acúmulos de células como parte de un efecto característico de la activación. Por otra parte, las pocas células que se obtuvieron después de los 7 días de cultivo estimulado con OVA también presentaron un cambio en relación a las células sin estímulo, generando un ligero incremento en el tamaño de la célula pero menos pronunciado que el de las estimuladas con el mitógeno y sin la formación de acúmulos (datos no mostrados).

Posteriormente se tiñieron para analizar diversas subpoblaciones de linfocitos (CD3CD4CD8), (CD25CD4CD8), ( $\gamma\delta$ CD4CD8) y (CD21CD5MHCII), se capturaron 20000 eventos en un citómetro de flujo FACScalibur, los datos obtenidos fueron analizados mediante el *software Flowjo* para obtener los porcentajes pertenecientes a cada subpoblación, estos valores fueron agrupados para obtener los promedio y SEM y poder comparar, para una misma subpoblación, aquellas células que fueron estimuladas contra las que no tuvieron estímulo, haciendo uso de la prueba de *t de Student* mediante el *software GraphPad*.

Los datos de la ausencia o presencia de diferencia estadísticamente significativa entre células estimuladas con ConA y sin estimular para cada subpoblación y grupos experimentales se muestran en la tabla 5. Para el caso de las células estimuladas con OVA contra las no estimuladas, no se encontró diferencia significativa para ninguna subpoblación ni grupo experimental.

**Tabla 5.** Diferencias estadísticamente significativas entre células sin estímulo y las estimuladas con ConA para las distintas subpoblaciones y grupos experimentales analizados.

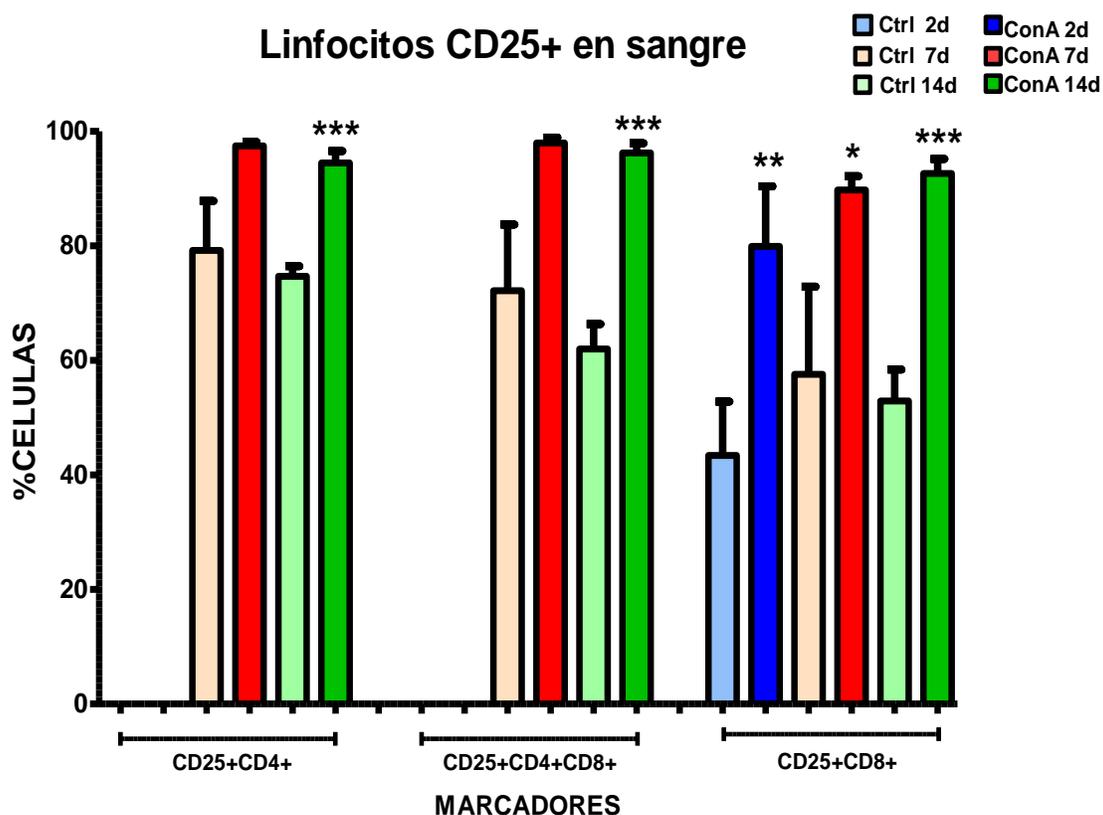
TEJIDOS POBLACIONES	SANGRE			GANGLIO			PULMÓN		
	2d	7d	14d	2d	7d	14d	2d	7d	14d
$\gamma\delta+$	SR	-	-	SR	-	-	SR	-	-
$\gamma\delta+CD4+$	SR	-	-	SR	-	-	SR	-	-
$\gamma\delta+CD4+CD8+$	SR	-	-	SR	-	-	SR	-	-
$\gamma\delta+CD8+$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	SR	-	-	SR	<*>	*	SR	-	-
<b>CD3+CD4+</b>	SR	*	-	SR	**	**	SR	-	-
<b>CD3+CD4+CD8+</b>	SR	-	-	SR	**	**	SR	-	-
<b>CD3+CD8+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CD25+</b>	SR	-	*	SR	-	**	SR	-	-
<b>CD25+CD4+</b>	SR	-	***	SR	-	***	SR	*	-
<b>CD25+CD4+CD8+</b>	SR	-	***	SR	*	**	SR	**	*
<b>CD25+CD8+</b>	**	*	***	**	*	**	-	-	**
<b>CD21+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CD21+CD5+</b>	-	-	-	-	-	-	-	<*>	-
<b>CD21+CD5+MHCII+</b>	-	-	*	-	*	*	-	*	-
<b>CD21+MHCII+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SR: sin Resultado. - : sin diferencia significativa. Significancia \*: P<0.05 \*\*; P<0.01 \*\*\*; P<0.001. Prueba estadística de distribución *t de Student*. <\*> = diferencia por debajo del control sin estímulo.

Se muestran los gráficos obtenidos de las células estimuladas con ConA con tinción triple, que permite observar las subpoblaciones CD25+CD4+, CD25+CD4+CD8+ (DP) y CD25+CD8+, que son las que mostraron diferencia estadística en los tres tejidos analizados.

### 7.2.3. Linfocitos CD25 en células de sangre estimuladas con ConA tras un cultivo de 4 días

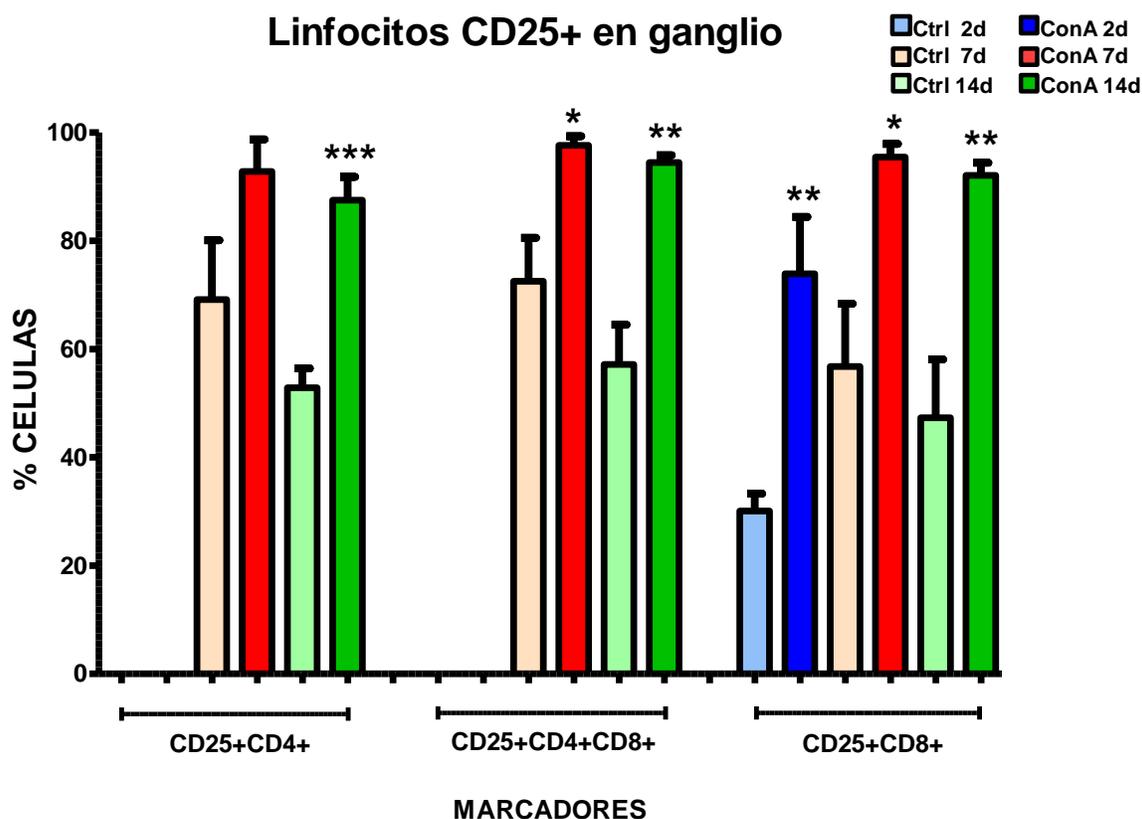
Para el caso del grupo de 2 días, no se realizó la tinción para identificar CD4, por lo que se reportó únicamente el valor para la subpoblación CD25+CD8+. Después de analizar los porcentajes, se observó que los grupos de 2 y 7 días solo muestran diferencias mayores entre células estimuladas contra las no estimuladas para la población CD25+CD8+ ( $P < 0.01$  y  $P < 0.05$  respectivamente), mientras que en el grupo de 14 días, las células estimuladas mostraron valores más altos respecto a las no estimuladas para las subpoblaciones CD25+CD4+, CD25+CD4+CD8+ (DP) y CD25+CD8+ ( $P < 0.001$ ) (figura 17).



**Figura 17. Porcentajes de linfocitos CD25+ en células de sangre estimuladas con ConA.** Se muestran los grupos de animales de 2, 7 y 14 días, representados en color azul, rojo y verde respectivamente; en tono claro se muestran las células sin estimular mientras que en tono oscuro las estimuladas con ConA; tras un cultivo de 4 días. Para el caso de 2 días no se realizó la tinción para CD4, por lo que no se reportan resultados. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el SEM. Diferencia significativa entre células sin estímulo y estimuladas. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . Prueba estadística *t de Student*.

#### 7.2.4. Linfocitos CD25 en células de ganglio estimuladas con ConA tras un cultivo de 4 días

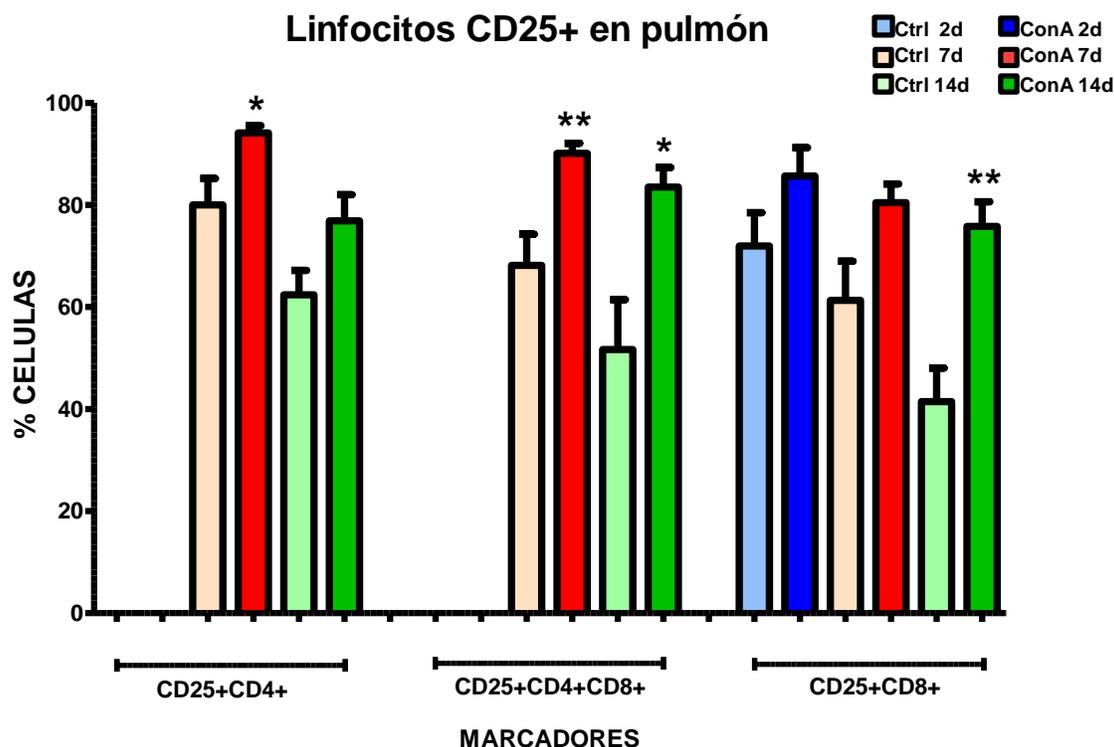
Para el grupo de 2 días, no se realizó la tinción para identificar CD4, por lo que se reportó únicamente el valor para la subpoblación CD25+CD8+. En el grupo de 2 días se encontró diferencia significativa para las células CD25+CD8+ ( $P < 0.01$ ); mientras que para el grupo de 7 días los valores estimulados fueron mayores respecto a los no estimulados en las poblaciones de CD25+CD4+CD8+ (DP) y CD25+CD8+ ( $P < 0.05$ ) y en el grupo de 14 días, las células estimuladas mostraron valores más altos respecto a las no estimuladas para las subpoblaciones CD25+CD4+CD8+ (DP), CD25+CD8+ ( $P < 0.01$ ) y CD25+CD4+ ( $P < 0.001$ ) (figura 18).



**Figura 18. Porcentajes de linfocitos CD25+ en células de ganglio estimuladas con ConA.** Se muestran los grupos de animales de 2, 7 y 14 días, representados en color azul, rojo y verde respectivamente; en tono claro se muestran las células sin estimular mientras que en tono oscuro las estimuladas con ConA; tras un cultivo de 4 días. Para el caso de 2 días no se realizó la tinción para CD4, por lo que no se reportan resultados. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el SEM. Diferencia significativa entre células sin estímulo y estimuladas. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . Prueba estadística *t de Student*.

### 7.2.5. Linfocitos CD25 en células de pulmón estimuladas con ConA tras un cultivo de 4 días

Para el grupo de 2 días, no se realizó la tinción para identificar CD4, por lo que se reportó únicamente el valor para la subpoblación CD25+CD8+. Se observó que el grupo de menor edad no mostró diferencias significativas entre las células no estimuladas y las estimuladas; mientras que en el grupo de 7 días las células estimuladas mostraron valores más altos comparadas con las sin estimular para las subpoblaciones CD25+CD4+ y las CD25+CD4+CD8+ (DP) ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente) y el grupo de 14 días tuvo valores mayores que las no estimuladas para las poblaciones CD25+CD4+CD8+ (DP) y CD25+CD8+ ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  respectivamente) (figura 19).



**Figura 19. Porcentajes de linfocitos CD25+ en células de pulmón estimuladas con ConA.** Se muestran los grupos de animales de 2, 7 y 14 días, representados en color azul, rojo y verde respectivamente; en tono claro se muestran las células sin estimular mientras que en tono oscuro las estimuladas con ConA; tras un cultivo de 4 días. Para el caso de 2 días no se realizó la tinción para CD4, por lo que no se reportan resultados. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el SEM. Diferencia significativa entre células sin estímulo y estimuladas. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ . Prueba estadística *t de Student*.

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL**

La IgG es la predominante en los fluidos internos del cuerpo, como son la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal, es la más abundante del suero pues constituye el 80% de las inmunoglobulinas totales (Devlin, 2004), su extensa variedad de funciones la hacen idónea para encontrarse en un medio donde fácilmente estará en contacto con otra gran cantidad de moléculas y células como el sistema del complemento, macrófagos y neutrófilos, células NK, entre otras (Galaktionov, 2004).

Por otra parte, la IgA sérica, se considera que puede ser un refuerzo pasivo ya que los inmunocomplejos con IgA son eliminados por el sistema fagocítico sin inflamación asociada. Más aún, la IgA sérica monomérica tiene actividad antiinflamatoria y es capaz de modular ciertas funciones como la fagocitosis inducida por IgG, actividad bactericida, estallido respiratorio y liberación de citocinas (Monteiro y Van de Winkel, 2003).

#### **8.1.1. Análisis de la respuesta de IgG e IgA en suero de lechones inmunizados**

En este estudio se determinó la respuesta inmunológica sistémica y mucosal generada por la inmunización perinatal con OVA, examinando el efecto de la edad.

Los resultados obtenidos indican que, en suero, los niveles de IgG e IgA, comienzan a incrementarse conforme avanzan las inmunizaciones, como ha sido descrito en otros trabajos (Lilo, 1988; Arvin y Greenberg, 2007), la concentración de Abs de ambos isotipos fue más elevada en el grupo de animales que comenzaron a inmunizarse a mayor edad.

Las concentraciones de Abs de los grupos que comenzaron a inmunizarse más jóvenes, 2 y 7 días, permanecieron por debajo del grupo de mayor edad y no fueron capaces de elevar dicha concentración a ese nivel, aun cuando ya habían alcanzado la edad y maduración de dicho grupo (figura 11), estos resultados apoyan la hipótesis clásica que describe la inmadurez del sistema inmunológico o el efecto de los factores inmunológicos transmitidos de la madre al neonato durante los primeros días de vida como factores supresores de una buena respuesta inmunológica (Jaspan y cols., 2006). Por lo tanto, estos datos sugieren que la inmunización muy próxima al nacimiento genera un bloqueo de la

respuesta inmunológica que impide la producción incrementada de Abs, originado probablemente por el efecto de los factores inmunorreguladores que trasmite la madre al neonato mediante el calostro durante los dos primeros días de vida previos al cierre del intestino (Tizard, 2004), tales como el TGF- $\beta$  y la IL-4, citocinas transferidas al suero del neonato en altas concentraciones dada su gran abundancia en calostro, disminuyendo así la producción de IgG e IgA. Cuando estos niveles de citocinas han disminuido se promueve el cambio de isotipo y la generación de IgG e IgA (Nguyeny cols., 2007).

Los niveles de IgA en suero, así como la literatura señala y es de esperar, mostraron una tendencia a incrementar por la exposición repetida al antígeno, pero también manifestaron un fenómeno no reportado en la literatura, una tendencia a mantener niveles invariables durante todo el periodo de prueba, aun cuando se esperaría que estas concentraciones de Abs disminuyeran paulatinamente ya que la vida media para este isotipo es de entre 4 y 6 días (Ho y cols., 1986; Slifka y cols., 1998).

Existen varias propuestas para dar explicación a la producción constante de Abs:

- Repetida exposición al patógeno
- Infección crónica de bajo grado
- Reactividad cruzada con antígenos propios o del medio ambiente
- Conexiones antiidiotípicas
- Complejos inmunológicos sobre FDC
- Células plasmáticas de larga vida.

Los primeros cinco modelos sugieren que la continua estimulación antigénica de las células B de memoria es necesaria para el mantenimiento de la producción de Abs de largo plazo (Slifka y Ahmed, 1996; Ahmed y Gray, 1996); la exposición repetida al Ag y la infección crónica de bajo grado son dos modelos que no se cumplen en este trabajo, puesto que los grupos de animales solo fueron tratados con el Ag durante el protocolo de inmunización, fuera de tiempo se evitó por completo su exposición al Ag el cual, además, no se trataba de un agente capaz de replicarse ni de causar una infección.

La hipótesis más popular y bien caracterizada sobre la producción persistente de Abs de largo plazo es que las células B de memoria son estimuladas por la presencia de Ag que es retenido en forma de complejos Ag-Ab sobre la superficie de las FDC (MacLennan y cols., 1997). Se cree que estos complejos con vida media de aproximadamente ocho semanas son liberados cuando los niveles de Abs disminuyen, con el fin de reestimar células B de memoria y que estas restituyan la disminución de la población de células plasmáticas (Tew y Mandel, 1979). Sin embargo, el efecto de este modelo debería ser capaz de observarse en ambos isotipos, de los cuales, aparentemente la IgA es la única afectada, probablemente porque los niveles en los que se encuentra están muy por debajo de los de IgG y/o el efecto de la inmunización IN, capaz de interactuar rápidamente con las FDC y caracterizada por producir buena respuesta de IgA tanto mucosal como sistémica (Wu y Rusell, 1997; Gerdtz y cols., 2006).

Un modelo que no es excluyente de los previamente mencionados es la producción prolongada de Abs por células plasmáticas de larga duración. Estas células pueden ser menos sensibles a los cambios en los niveles de Ag ya que regulan a la baja la inmunoglobulina de superficie y las moléculas MHC de clase II, por lo tanto, la pérdida de la presencia del Ag no tiene un impacto en su longevidad (Abney y cols., 1978). Este modelo es quizá el que más respalda la producción constante de Abs IgA en suero. Posteriormente a la inmunización IN, los linfocitos B son estimulados y pasan a células plasmáticas secretoras de IgA, estas células son capaces de migrar a la médula ósea, principal sitio de almacenamiento de células plasmáticas de larga duración (Slifka y cols., 1995), donde serán capaces de perdurar incluso por más de 90 días en ausencia de división celular y mantener una secreción constante de Abs a la circulación (Manz y cols., 1997).

La respuesta de IgA de este trabajo mostró un fenómeno interesante el cual debería ser analizado más a fondo, puesto que los niveles de este isotipo no han sido estudiados abundantemente y representarían un importante avance en la inmunización perinatal.

### 8.1.2. Análisis de la respuesta de IgG en mucosas de lechones inmunizados

Los Abs son particularmente efectivos para proteger, como primera línea de defensa, los sitios de entrada de agentes patógenos al organismo como la boca y la nariz. La gran mayoría de antígenos que son capaces de entrar por estas vías expresan moléculas en su superficie, que son utilizadas para fijarse, penetrar y colonizar los tejidos. Si existen Abs capaces de unirse a esas moléculas, podrán prevenir la entrada de los Ags. En las vías respiratorias, la IgA es la inmunoglobulina predominante a excepción de los pulmones donde la IgG cobra mayor importancia (Halliwell y Gorman, 1992; Delventhal y cols., 1992; Pabst y Binns, 1994). En términos generales, este estudio mostró que la IgG tanto en saliva como en secreción nasal (figuras 12a y 13a) tuvo un comportamiento semejante al observado en suero, solo que en niveles más bajos, lo que sugiere que la presencia de este Ab en estos sitios, sea efecto de la extravasación de la inmunoglobulina sistémica a las secreciones por consecuencia de pequeñas inflamaciones, sangrados, su bajo peso molecular (150 kDa) que le permite fácilmente pasar a los tejidos, o el transporte cruzado mediado por el FcRn (Ogra y Ogra, 1973; Bouvet y cols., 1994; Persson y cols., 1998; Spiekermann, 2002; Devlin, 2004; Claypool, 2004; Yoshida y cols., 2004). La baja concentración de IgG en secreciones comparada con la de suero puede ser efecto de la baja extravasación o la acción de enzimas proteolíticas sobre la inmunoglobulina (Haber y Stone, 1967; Whaley y Zeitlin, 2001). Cabe mencionar que la baja presencia de ésta en las mucosas podría en cierta parte ser favorable, ya que su capacidad de generar inflamación no es muy deseable a este nivel pues provocaría daños importantes sobre todo en la mucosa de neonatos (Devlin, 2004), por lo tanto, un efecto de la presencia de IgA sería dotar a la mucosa de la exclusión inmunológica que le permita protegerse sin alterar su homeostasis.

Los picos grandes y espontáneos observados en la secreción nasal del grupo de 7 días (figura 13a), mostraron una dispersión de datos muy amplia lo cual se traduce en que no todos los animales dieron respuesta, sugiriendo la heterogeneidad en la producción y secreción de IgG y probablemente señalando la incipiente maduración.

### 8.1.3. Análisis de la respuesta de IgA en mucosas de lechones inmunizados

La IgA, aunque solo constituye el 10% del total de las inmunoglobulinas séricas, es la clase de inmunoglobulina que predomina en secreciones, como la saliva y secreción nasal. Funcionalmente es una opsonina menos potente que la IgG y un activador débil del complemento (Bailey y cols., 2005; Eng y cols., 2010). Se analizó la respuesta de IgA en saliva y secreción nasal, los resultados mostraron que los animales que comenzaron a estimularse más jóvenes, únicamente para IgA y en secreciones, generaron una respuesta por arriba de los otros dos grupos, pero solo hasta el día 55 - 60 donde se produce un abrupto descenso, disminuyendo significativamente en relación al nivel de los otros grupos experimentales, aunque en el muestreo final y después del RIN los niveles de los tres grupos se igualó (figuras 12b y 13b).

Estos datos coinciden con la idea, de un sistema inmunológico de las mucosas separado del sistema periférico, que podría representar dos mecanismos de defensa, uno estructurado y localizado y uno sistémico más difuso (Conley y Delacroix, 1987; Kroemer y cols., 1993; Wu y Rusell, 1997; McGhee y Kiyono, 1999) que muestra que la respuesta inmunológica sistémica no es igual a la mucosal.

Trabajos previos muestran que aunque las respuestas Th1 pueden ser obtenidas a partir de los recién nacidos, a menudo sobresalen las respuestas secundarias tipo Th2. En la década de 1990, se observó un sesgo Th2 en ratones recién nacidos vacunados con una variedad de Ags utilizando como adyuvante hidróxido de aluminio, el cual se aprobó para uso pediátrico en humanos (Martinez y cols., 1997). Posteriormente se reportaron respuestas Th2 en los recién nacidos vacunados con virus vivos o atenuados mientras que los adultos inmunizados comparativamente desarrollaron respuestas Th1 (Bot y cols., 1999). El uso de Ags proteicos en PBS para la inmunización de animales recién nacidos también ha mostrado la formación de respuestas dominantes tipo Th2 (Gebel y cols., 1983). Por último, se han descrito respuestas Th2 Ag-específicas en los ganglios linfáticos de animales adultos originalmente inmunizados de recién nacidos (Min y cols., 2000). Por lo tanto, bajo muchas condiciones, los recién nacidos parecen estar sesgados a la respuesta de tipo Th2. El microambiente de los neonatos parece favorecer respuestas Th2 y la existencia

de células B pre-comprometidas a la producción de SIgA es una de las razones por las que esta inmunoglobulina predomina en tejidos mucosales.

Pocos estudios, principalmente en roedores, se han realizado sobre la respuesta inmunológica en mucosas generada tras la inmunización perinatal, gran parte de estos estudios centran su atención en observar la respuesta sistémica o a nivel de la mucosa intestinal (Newby, 1984; Newby y Stokes, 1984; Brandtzaeg y cols., 1987; Jertborna y cols., 1996; Ahrén y cols., 1998). Quizá la respuesta de IgA obtenida en este trabajo y bajo estas condiciones sea efecto del tráfico de linfocitos en los tejidos específicos como parte del mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico. Se sabe que la migración de los linfocitos está mediada por una cascada de interacciones entre la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas secretadas por los tejidos, y los receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión sobre los linfocitos. A nivel del tracto respiratorio superior (particularmente NALT) y aun cuando no se han formado el BALT (no constitutivo en cerdos y humanos), la quimiocina CCL28, también conocida como quimiocina epitelial asociada a mucosa (MEC), es un potente quimioatrayente para expresar CCR10 sobre ASC del isotipo IgA (Lazarus, 2003), dirigiendo de manera selectiva a estas células pero no a ASC del isotipo IgG o IgM. El CCL28 ejerce su función mejorando la adherencia de la integrina  $\alpha 4$ , tanto a la molécula de adhesión celular dirigida a mucosa – 1 (MadCAM-1), como a la molécula de adhesión celular vascular – 1 (VCAM-1). CCL28, sobre todo en las glándulas salivales, es secretada en altos niveles por células epiteliales de recién nacidos y con una tendencia a disminuir y estabilizar su expresión conforme transcurre la vida (Hieshima y cols., 2003). Aunado a esta información, después de la inmunización sistémica, el receptor de migración predominante sobre las ASC es la L-selectina, después de la vacunación oral es la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , y después de la inmunización nasal el linfocito expresa tanto la L-selectina y la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (McGhee y cols., 1999). En concreto, la alta expresión de CCL28 en las vías respiratorias superiores después del nacimiento y el efecto del protocolo de inmunización, probablemente sean los responsables de la migración acrecentada de ASC del isotipo IgA a la mucosa y por ende la mayor y rápida producción de Abs en los animales de menor edad, mientras que este proceso comienza a verse disminuido en función de la edad, dejando al grupo que comenzó a inmunizarse a los 7 días con una producción de Abs por en medio de la generada por el

grupo de 2 y 14 días, éste último siendo el más lento y con menor nivel de Abs. Las posibles razones, 1) la disminución en la secreción de quimiocina CCL28, originando menor migración de ASC del isotipo IgA a las vías respiratorias altas, 2) el mayor tiempo de exposición antigénica previa a la aplicación del protocolo de inmunización, tal vez provocando el comienzo de la formación del BALT y la implicación de otros mecanismos de migración menos selectivos para ASC del isotipo IgA, 3) la maduración del organismo (mejora en mecanismos inespecíficos de defensa, colonización por flora normal, equilibrio entre respuesta Th1/Th2, mecanismos de regulación) quizá generen un ambiente donde la producción elevada de Abs ya no sea requerida.

Dos semanas previas al sacrificio de los animales se realizó un refuerzo por vía IN, con el objetivo de estimular el sistema inmunológico para fortalecer las respuestas celulares que se analizarían como segunda parte del trabajo. Por otra parte, el refuerzo permitió evaluar la respuesta de células B de memoria, fue posible observar, para ambos isotipos y en los tres tipos de muestras analizadas, como los niveles de Abs comenzaron un descenso, sin embargo, en cuanto se aplicó el refuerzo, se detuvo el descenso y los niveles se mantuvieron e incluso iniciaron un ligero aumento (figura 11-13), siendo un posible reflejo de la presencia del tránsito de linfocitos B de memoria entre órganos linfoides secundarios, capaces de reconocer y responder rápidamente ante el antígeno y redireccionarse hacia el tejido objetivo (Yong y Arpin, 1997; Sprent, 1997), además estas células de memoria tienden a migrar al sitio donde originalmente fueron activadas (Mackay y cols., 1990; Springer, 1994; Butcher y Picker, 1996), y dado que el refuerzo fue aplicado por vía IN, quizá sea la razón por la cual este efecto fue más notorio en el análisis de secreción nasal, seguido de la saliva y suero.

El grupo de 2 días, entre los muestreos de los días 48 y 55 mostró un abrupto descenso en los niveles de IgA en ambas secreciones y aunque en la última fecha del experimento los niveles de esta inmunoglobulina se vuelven a equiparar, se podría pensar que este efecto sea consecuencia de un repentino cambio en el ambiente celular debido a la rápida producción de Abs y la falta de presencia antigénica.

#### **8.1.4. Análisis de la respuesta de IgG e IgA en LBA de lechones inmunizados**

El sacrificio de los animales se llevó a cabo a los 3 meses de edad, con el fin de evaluar la respuesta de memoria después de la inmunización temprana, de ambos isotipos a nivel pulmonar, para lo que se tomó una muestra de LBA. Los niveles de IgG no mostraron diferencia en ninguno de los grupos (figura 14a), mientras que para IgA, existió un incremento de esta inmunoglobulina por parte del grupo de 2 días con relación a los demás y entre el grupo de 14 días contra el de 7 (figura 14b). Cabe recordar que esta muestra fue obtenida cuando los tres grupos de animales tenían la misma edad (3 meses) y lo único que los distinguía era la edad a la que comenzaron a inmunizarse, por lo tanto no se esperaba que los valores difirieran.

A nivel alveolar, varios estudios indican que la IgG es la inmunoglobulina predominante (Halliwell y Gorman, 1992; Delventhal y cols., 1992; Pabst y Binns, 1994), lo cual fue posible observar en estos resultados, cuando los niveles de IgA en LBA solo alcanzan los 60 ng, la IgG tiene un valor por arriba de los 100 ng. Esto podría ser resultado de la alta irrigación sanguínea que ocurre en los pulmones, permitiendo la trasudación de IgG, y a pesar de los niveles de esta inmunoglobulina en suero, es posible detectar cantidades semejantes para los tres grupos experimentales, ya que es menor la degradación de IgG por enzimas proteolíticas dada la zona en la que se encuentran.

Con relación a la IgA se observó un efecto interesante, independientemente de que los animales tenían la misma edad y el mismo régimen de reinmunización, los niveles de esta inmunoglobulina producida localmente, fueron mayores en animales inmunizados a menor edad, este fenómeno parece indicar que el resultado de inmunizar a edades tempranas es capaz de trascender por un largo periodo de tiempo, además, las consecuencias en el propio organismo al montar una respuesta mediada por esta inmunoglobulina pueden ser favorables dada su propiedad antiinflamatoria y con ello ocasionar menos daños que si fuera mediada por IgG.

Durante los primeros días de vida, en las mucosas, se establecen cantidades considerables de ASC principalmente del isotipo IgA, ya que ésta es uno de los principales factores que median la relación con la microbiota y permite la adecuada colonización, por

lo que las diferencias que se encontraron quizá estén relacionadas a la cantidad de linfocitos B de memoria generada por el efecto de la inmunización a distintas edades y cantidades de células presentes en ese momento, los cuales serán capaces de responder y secretar IgA en proporciones desiguales (Yong-Jun y Arpin, 1997; Sprent, 1997; Ramiro-Puig y cols., 2008).

Por lo tanto, el protocolo de inmunización perinatal propuesto, aplicado a muy corta edad (2 días) fue capaz de generar una respuesta importante de Abs IgA en mucosas, lo que podría llegar a ser sustancial para la protección durante este periodo de alto riesgo, además de permitir la generación de buenas respuesta de memoria capaces de presentarse en retos antigénicos posteriores, es así como estos datos abren un posible campo de trabajo para corroborar y ampliar resultados e información.

## **8.2. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES**

La respuesta inmunológica celular está a cargo de los linfocitos T, de los cuales hay 3 tipos: los linfocitos T cooperadores (CD4) que secretan citocinas, las cuales se encargan de estimular a otras células; los linfocitos T citotóxicos (CD8) que se encargan de destruir específicamente a las células infectadas y, finalmente, los linfocitos T reguladores encargados de impedir la autoinmunidad y controlar la amplitud de la respuesta inmunológica. Esta respuesta induce también la producción de células de memoria, con las cuales se puede montar una respuesta mucho más rápida en las subsecuentes interacciones con el Ag (Margni, 1996).

### **8.2.1. Análisis de las diversas subpoblaciones de linfocitos T y B provenientes de tejidos de cerdos**

La parte celular del experimento tuvo como objetivo analizar diversas subpoblaciones de linfocitos T y B en sangre, ganglio y pulmón de los cerdos inmunizados a diferentes edades, dicho análisis se hizo a los 3 meses de edad para todos los animales, las células fueron estimuladas *in vitro* con ConA (usado como control positivo) y OVA para evaluar la respuesta específica.

La prueba de IDR realizada al día 27 del experimento (independientemente de la edad del cerdo) fue la primer investigación de la respuesta celular, no mostró ningún resultado

positivo (datos no reportados), lo que sugiere que la inmunidad celular (respuestas tipo Th1) no se vió favorecida por la inmunización perinatal, probablemente debido a la baja producción de citocinas para este perfil (Bot y cols. 1997; Adkins y Du, 1998), además la proteína soluble OVA empleada para inmunizar, seguramente fue tratada como un Ag exógeno, procesado y presentado en moléculas MHC-II a células T CD4+, evitando o disminuyendo la respuesta celular y favoreciendo la humoral (Germain, 1999; Villadangos, 2001). Así mismo, la OVA, es un Ag incapaz de replicarse y el adyuvante (únicamente aceite mineral), seguramente no generaron respuesta celular.

La lectina ConA es capaz de unirse a residuos de  $\alpha$ -manósidos y  $\alpha$ -glucósidos de glucoproteínas en la superficie de los linfocitos, induciendo la activación y proliferación policlonal (Barta y Oyekan, 1981), generando así diferencias contra células sin estímulo; sin embargo, el análisis de las subpoblaciones de linfocitos mostró escasas diferencias en casi todas las subpoblaciones (tabla 5), siendo solo posible detectar la activación mediante la expresión del CD25 (figuras 17 - 19) y el cambio en la morfología celular, que fue notable, ya que las células aumentaron su tamaño y se agruparon formando grumos inconfundibles para todos los grupos y tejidos. Es decir, el mitógeno fue capaz de activar a las células independientemente del tejido y la edad de inmunización, mostró que el cultivo y la estimulación *in vitro* funcionó. Sin embargo, no fue capaz de inducir una proliferación de las subpoblaciones que la diferenciara del cultivo sin estímulo, o la proliferación fue en todas las subpoblaciones y al evaluar los porcentajes, éstos no cambiaron con respecto al control sin estimular. Los trabajos que se han dedicado al estudio *in vitro* de poblaciones celulares bajo estímulos mitogénicos proponen el uso de otras moléculas estimuladoras como la IL-2 (Frauwirth y Thompson, 2002) y/o coestimuladoras como el CD28 sobre los linfocitos y CD80, CD86 para las APC (Secchiero y cols., 2000) en el cultivo, situación que no se llevo a cabo en este trabajo.

La respuesta celular específica se analizó por la estimulación *in vitro* con OVA; los resultados mostraron que para ninguno de los grupos y tejidos analizados existió activación ni proliferación. A pesar de que se observaron cambios en el tamaño de las células que indican una posible activación celular en los cultivos estimulados, el análisis por citometría de flujo no lo respaldó.

La falta de respuesta celular específica puede ser consecuencia de que el Ag empleado para inmunizar a los animales favorece la respuesta inmunológica humoral (Germain, 1999; Villadangos, 2001), por otra parte existen una gran diversidad de receptores linfocitarios para Ags, es decir, que cada linfocito posee un receptor diferente y por tanto el número de linfocitos capaces de unirse y responder a un Ag específico es muy reducido (relación 1:10000 y 1:100000) del número total de linfocitos (Parham, 2006), lo que indica que si existían células específicas contra OVA no fueron suficientes (en cantidad) como para dar una diferencia significativa contra las no estimuladas, además si consideramos que al citómetro únicamente se realizó el conteo de 20000 eventos, la probabilidad de encontrar diferencias se vio muy reducida.

Finalmente, la gran cantidad de “basura” observada en los *dot-plots* (figuras 15A y 16A) mostró la poca viabilidad de las células al momento de la lectura, siendo un posible reflejo de su excesiva manipulación, de los constantes cambios de temperatura a los que se sometieron, el tiempo que permanecieron fuera de un sistema viable, su saturación en el medio de cultivo, entre otras condiciones técnicas, siendo quizá dicha situación la razón más importante en la falta de resultados.

El modelo utilizado en este proyecto con minicerdos vietnamita SPF, cuya microbiota podría ser diferente a la de cerdos convencionales, quizá repercuta en la activación diferencial del sistema inmunológico y en otros modelos podrían obtenerse resultados distintos. Sin embargo, la información es valiosa dado que la respuesta inmunológica perinatal a nivel de mucosas no se ha descrito antes.

Para los grupos experimentales, se utilizaron 5 lechones provenientes de la misma camada y asignados de esta forma a un grupo específico, por lo que sería interesante aumentar el número de cerdos para descartar que esto sea un factor en los resultados obtenidos.

## 9. CONCLUSIÓN

El efecto de la inmunización perinatal mediante el protocolo SubC/SubC/IN evidenció la compartimentalización de la respuesta inmunológica; a nivel sistémico se genera una respuesta de Abs (IgA e IgG) que incrementa conforme aumenta la edad y maduración de los animales, a nivel de secreciones (mucosas) la inmunización produjo una respuesta de IgG semejante a la encontrada en suero, mientras que la IgA mostró un comportamiento opuesto, ya que se ve favorecida en animales inmunizados a menor edad, además, el efecto de emplear este protocolo y bajo estas condiciones parece ser capaz de trascender por largos periodos de tiempo.

El cultivo de células de todos los tejidos y todos los grupos no mostró más que una posible activación (mediada por el análisis de CD25) en aquellas estimuladas con ConA, mientras que el análisis de la respuesta específica no resultó para ninguna población, toda esta evidencia señala que para este experimento la respuesta inmunológica fue de tipo Th2.

La inducción de respuesta inmunológica perinatal en mucosas es factible y se ve favorecida en animales de menor edad, siendo este protocolo una posible propuesta para disminuir la tasa de infecciones respiratorias propias de la edad. Además de abrir un amplio campo de investigación.

## **10. PERSPECTIVAS**

Para corroborar resultados, es necesario realizar repeticiones del experimento para los cuales se sugieren algunos cambios que podrían proporcionar mayor información, como evaluar el nivel de protección a través del empleo de un Ag que permita el desafío con el fin de aportar una idea más clara sobre la edad óptima de inmunización perinatal así como el nivel de protección que genera.

En cuanto a los estudios de la respuesta celular, sería importante emplear un Ag capaz de estimular una respuesta Th1; así como variar las condiciones de los cultivos celulares como son el tiempo de incubación, el número de reestímulos y el número de células tanto sembradas, cosechadas y leídas al citómetro. También, de forma muy importante, el control en la manipulación y tratamiento de las células para favorecer su viabilidad.

Adicionalmente, el empleo de un Ag que afecte la mucosa respiratoria a nivel humano o veterinario podría proporcionar mayor información.

## 11. ANEXO

### Soluciones

#### Solución salina fisiológica (SSF)

Cloruro de sodio (NaCl)\_\_\_\_\_ 0.9 %

Agua destilada

#### Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 - 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)\_\_\_\_\_ 137 mM

Cloruro de potasio (KCl)\_\_\_\_\_ 2.7 mM

Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )\_\_\_\_\_ 4.3 mM

Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )\_\_\_\_\_ 1.4 mM

Agua destilada

#### Amortiguador de lisis de eritrocitos

Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )\_\_\_\_\_ 0.14 M

Bicarbonato de potasio ( $\text{KHCO}_3$ )\_\_\_\_\_ 1 mM

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ )\_\_\_\_\_ 0.1 mM

Agua destilada

#### Medio RPMI-1640 incompleto

RPMI-1640 Medium (con L-glutamina y 25 mM HEPES, sin  $\text{NaHCO}_3$ )\_\_\_\_\_ 1 frasco

Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )\_\_\_\_\_ 2 g

Agua bidestilada\_\_\_\_\_ c.b.p. 900 mL

Ajustar pH a 7.2 y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Realizar pruebas de esterilidad.

### **Medio RPMI-1640 completo**

Medio RPMI-1640 incompleto	450 mL
Glutamina ( $C_5H_{10}N_2O_3$ )	0.2 mM
Piruvato de sodio ( $C_3H_3NaO_3$ )	0.1 mM
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanol sulfónico (HEPES) ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ )	1 mM
$\beta$ -mercaptoetanol ( $HOCH_2CH_2SH$ )	0.1 $\mu$ M
Gentamicina ( $C_{21}H_{43}N_5O_7$ )	40 $\mu$ g/mL
Suero fetal bovino (SFB)	10 %

### **Solución con enzima (colagenasa)**

Colagenasa tipo IV (Worthington Biochemical Corporation, USA)	150 UI/mL
Medio RPMI-1640 incompleto	

### **Solución de azul de tripano**

Azul de tripano	0.4 %
Solución salina fisiológica	

### **Solución fijadora de *p*-formaldehído 1%**

<i>p</i> -formaldehído al 4%	12.5 mL
Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X)	c.b.p. 50 mL

### **Solución A de citometría de flujo**

Suero normal de cerdo (descomplementado)	5 %
Azida de sodio ( $NaN_3$ )	0.1 %
Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)	

### **Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6**

Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) 0.5 M	2.5 mL
Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ) 0.5 M	7.5 mL
Agua destilada	c.b.p. 100 mL

### **Solución general para la técnica de ELISA IgG pH 8.0**

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) [(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>]\_\_\_\_\_ 50 mM  
Cloruro de sodio (NaCl)\_\_\_\_\_ 0.14 M  
Agua destilada

### **Solución de lavado para la técnica de ELISA IgG**

Tris (hidroximetil) aminometano [(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>]\_\_\_\_\_ 50 mM  
Cloruro de sodio (NaCl)\_\_\_\_\_ 0.14 M  
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>)\_\_\_\_\_ 0.05 %  
Agua destilada

### **Solución de bloqueo para la técnica de ELISA IgG**

Tris (hidroximetil) aminometano [(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>]\_\_\_\_\_ 50 mM  
Cloruro de sodio (NaCl)\_\_\_\_\_ 0.14 M  
Albúmina sérica bovina (BSA)\_\_\_\_\_ 1 %  
Agua destilada

### **Solución de dilución para la técnica de ELISA IgG**

Tris (hidroximetil) aminometano [(HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>]\_\_\_\_\_ 50 mM  
Cloruro de sodio (NaCl)\_\_\_\_\_ 0.14 M  
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>)\_\_\_\_\_ 0.05 %  
Albúmina sérica bovina (BSA)\_\_\_\_\_ 1 %  
Agua destilada

### **Solución amortiguadora de citratos pH 5.0**

Citrato de sodio dihidratado (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2 H<sub>2</sub>O)\_\_\_\_\_ 0.02 M  
Ácido cítrico monohidratado (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)\_\_\_\_\_ 0.01 M  
Agua destilada

### **Solución de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina**

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) ( $C_{16}H_{20}N_2$ ) \_\_\_\_\_ 1 mg/mL

Dimetilsulfóxido (DMSO) ( $CH_3SOCH_3$ ), Mantener a  $-20^{\circ}C$ .

### **Solución de revelado para la técnica de ELISA IgG**

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) ( $C_{16}H_{20}N_2$ ) [1 mg/mL] \_\_\_\_\_ 1 mL

Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) 30 % \_\_\_\_\_ 2  $\mu$ L

Solución amortiguadora de citratos pH 5.0 \_\_\_\_\_ 10 mL

### **Solución de paro para la técnica de ELISA IgG**

Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) \_\_\_\_\_ 2 M

Agua destilada

### **Solución general para la técnica de ELISA IgA (PBS-Tween) pH 7.4**

Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) ( $C_{58}H_{114}O_{26}$ ) \_\_\_\_\_ 0.05 %

Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X)

### **Solución amortiguadora de dietanolamina**

Dietanolamina ( $C_4H_{11}NO_2$ ) \_\_\_\_\_ 1 mM

Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 0.5 M \_\_\_\_\_ 1 mL

Agua destilada \_\_\_\_\_ c.b.p. 1000 mL

### **Solución *stock* de *p*-nitrofenil fosfato (PNPP)**

*p*-nitrofenilfosfato (PNPP) \_\_\_\_\_ 1g/10 mL

Solución amortiguadora de dietanolamina, Mantener a  $-20^{\circ}C$ .

### **Solución de revelado para la técnica de ELISA IgA**

*p*-nitrofenilfosfato (PNPP) [1g/10 mL] \_\_\_\_\_ 100  $\mu$ l

Solución amortiguadora de dietanolamina \_\_\_\_\_ 10 mL

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. (2004). *Inmunología celular y molecular*. 5ta edición, Elsevier. Madrid, España. Pg. 563.
- Abney E, Cooper M, Kearney J, Lawton A, Parkhouse R. (1978). Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J. Immunol.* 120: 2041 - 2049.
- Abraham E. (1992). Intranasal immunization with bacterial polysaccharide containing liposomes enhances antigen-specific pulmonary secretory antibody response. *Vaccine* 10(7): 461 - 468.
- Adkins B, Du R. (1998). Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. *J. Immunol.* 160(9): 4217 - 4224.
- Adkins B, Bu Y, Guevara P. (2001). The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J. Immunol.* 166(2): 918 - 925.
- Aguilera N, Pérez M, López M, Martín JM. (2004). *Inmunología*. 23(2): 207 – 216.
- Ahmed R, Gray D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 272(5258): 54 - 60.
- Ahrén C, Jertborn M, Svennerholm AM. (1998). Intestinal immune responses to an inactivated oral enterotoxigenic *escherichia coli* vaccine and associated immunoglobulin A responses in blood. *Infect. Immun.* 66(7): 3311 – 3316.
- Allison T, Garboczi D. (2002). Structure of gamma delta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Molecular Immunology*. 38(14): 1051 – 1061.
- Alvarado César Gabriela (2011). Efecto de diferentes vías de inmunización sobre la respuesta inmune sistémica y local a ovoalbúmina en cerdos destetados. Tesis de licenciatura en proceso para MVZ de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán-UNAM.
- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. (2002). Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J. Exp. Med.* 196(3): 379 - 387.

- Arkachaisri T, Ballow M. (1999). Developmental immunology of the newborn. *Immunol. Allergy Clin. North.* 19(2): 253 - 279.
- Arranz E, Garrote J. (2006). El sistema inmune de la mucosa gastrointestinal. *Inmunología General. Departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología. Valladolid, España.* Pp. 1–5.
- Avanzini M, Pignatti P, Chirico G, Gasparoni A, Jalil F, Hanson L. (1998). Placental transfer favours high avidity IgG antibodies. *Acta Paediatr.* 87(2): 180 - 185.
- Baba T, Liska V, Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Xu W, Ayeahunie S, Cavacini L, Posner M, Katinger H, Stiegler G. (2000). Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* 6(2): 200 – 206.
- Bach J. (2003). Regulatory T cells under scrutiny. *Nature Rev. Immunol.* 3(3):189–198.
- Bailey M, Haverson K, Inman C, Harris C, Jones P, Corfield G, Miller B, Stokes C. (2005). The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc. Nutr. Soc.* 64: 451–457.
- Barta O, Oyekan P. (1981). Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 4 (2): 209 - 221.
- Beck G, Gail S. (1996). Immunity and the invertebrates. *Scientific American.* 17(1): 60 – 66.
- Belloni C, De Silvestri A, Tinelli C, Avanzini MA, Marconi M, Strano F, Rondini G, Chirico G. (2003). Immunogenicity of a three-component a cellular pertussis vaccine administered at birth. *Pediatrics.* 111(5 Pt 1): 1042 - 1045.
- Bergmann K, Waldman R. (1988). Stimulation of secretory antibody following oral administration of antigen. *Rev. Infect. Dis.* 10(5): 939 - 950.
- Biesbrock A, Reddy M, Levine MJ. (1991). Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect. Immun.* 59(10): 3492 – 3497.
- Birchall MA, Bailey M, Barker E, Rothkötter H, Otto K, Macchiarini P. (2002). Model for experimental revascularized laryngeal allotransplantation. *British Journal of Surgery.* 89(11): 1470 – 1475.

- Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. (2001). Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(4): 516 – 520.
- Bluestone J, Abbas A. (2003). Natural versus adaptative regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3(3): 253 – 257.
- Born W, Cady C, Jones-Carson J, Mukasa A, Lahn M, O'Brien R. (1999). Immunoregulatory functions of  $\gamma\delta$  T cells. *Adv. Immunol.* 71: 77–144.
- Bot A, Antohi S, Bot S, Garcia-Sastre A, Bona C. (1997). Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. *Int. Immunol.* 9(11): 1641 - 1650.
- Bot A, Bot S, Bona C. (1999). Enhanced protection against influenza virus of mice immunized as newborns with a mixture of plasmids expressing hemagglutinin and nucleoprotein. *Vaccine* 16(17): 1675 - 1682.
- Bouvet JP, Bélec L, Pirés R, Pillot J. (1994). Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination. *Infect. Immun.* 62(9): 3957 – 3961.
- Bouvet JP, Fischetti V. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal immune barrier. *Infect. Immun.* 67(6): 2687 – 2691.
- Brandtzaeg P, Prydz H. (1984). Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 311(5981): 61 – 73.
- Brandtzaeg P, Bjerke K, Kett K, Kvale D, Rognum T, Scott II, Sollid L, Valnes K. (1987). Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Ann. Allergy.* 59(5): 21 - 39.
- Brandtzaeg P. (1995). Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS.* 103(1): 1 – 19.
- Brandtzaeg P, Farstad I, Haraldsen G. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same tract. *Immunol. Today* 20(6): 267 – 277.
- Brandtzaeg P, Farstad I. (1999). The human mucosal B-cell system. In Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, McGhee JM, Bienenstock J. (ed.) *Handbook of mucosal immunology.* Academic Press, Inc. San Diego, Calif. Pp. 439 – 468.

- Broide D. (2001). Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(2): 65 - 71.
- Butcher EC, Picker LJ. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 272(5258): 60 - 66.
- Butler JE, Marek S. (2007). The isolator piglet: a model for studying the development of adaptive immunity. *Immunol. Res.* 39(1-3): 33 – 51.
- Butler JE, Lager KM, Splichal I, Francis D, Kacs Kovics I, Sinkora M, Wertz N, Sun J, Zhao Y, Brown WR, DeWald R, Dierks S, Muyldermans S, Lunney JK, McCray PB, Rogers CS, Welsh MJ, Navarro P, Klobasa F, Habe F, Ramsoondar J. (2008). The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128(1-3): 147 – 170.
- Chick H, Fotheringham T, Macrae A, Archer J, Porter M, Charles JM. (1938). Experiments with pigs on a pellagra-producing diet. *Biochem. J.* 32(5): 844 – 854.
- Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M. (2000). Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell Immunol.* 205(2): 110 - 119.
- Claypool SM. (2004). Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fc $\gamma$ -receptor. *Mol. Biol. Cell.* 15(4): 1746 – 1759.
- Conley ME, Delacroix DL. (1987). Intravascular and mucosal IgA: two separate but related systems of immune defence. *Ann. Intern. Med.* 106(6): 892 – 899.
- Corr SC, Gahan CC, Hill C. (2008). M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52(1): 2 – 12.
- Corthésy B, Kraehenbuhl JP. (1999). Antibody-mediated protection of mucosal surfaces. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236(5): 93 – 111.
- Corthésy B, Spertini F. (1999). Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem.* 380(11):1251- 1262.
- Cunningham–Rundles S. (2004). The effect of Aging on Mucosal Host Defense. *Journal of Nutrition. Health and Aging.* 8(1): 20 – 25.

- Czerkinsky C, Svennerholm AM, Quiding M, Jonsson R, Holmgren J. (1991). Antibody-producing cells in peripheral blood and salivary glands after oral cholera vaccination of humans. *Infect. Immun.* 59(3): 996 - 1001.
- Debertin AS, Tschernig T, Tönjes H, Kleemann WJ, Tröger HD, Pabst R. (2003). Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clin. Exp. Immunol.* 134(3): 503 – 507.
- Delventhal S, Hensel A, Petzoldt K, Pabst R. (1992). Cellular changes in the bronchoalveolar lavage (BAL) of pigs, following immunization by the enteral or respiratory route. *Clin. Exp. Immunol.* 90(2): 223-227.
- Dennis W. (2007). *IgA and respiratory immunity*. Editorial Springer. Albany Medical College, Albany, New York, USA. Pp. 271 - 273.
- Devlin T. (2004). *Bioquímica*. 4ta. Edición. Reverté, Barcelona, España. Pp. 325 – 338.
- Dickinson BL, Badizadegan K, Wu Z, Ahouse JC, Zhu X, Simister NE, Blumberg RS, Lencer WI. (1999). Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* 104(7): 903 – 911.
- Duque N, Gomez-Guerrero C, Egido J. (1997). Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemo attractant protein-1, IL-8, and IFN- $\gamma$  inducible protein 10. *J. Immunol.* 159(7): 3474 – 3482.
- Elmore SA. (2006). Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol.* 34(5): 687 – 696.
- Eng, Nelson F, Garlapati, Srinivas, Gerds, Volker, Babiuk, Lorne A, Mutwiri, George K. (2010). PCEP enhances IgA mucosal immune responses in mice following different immunization routes with influenza virus antigens. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines.* 8(4): 1-11.
- Eskola J, Käyhty H. (1998). Early immunization with conjugate vaccines. *Vaccine.* 16(14-15): 1433 – 1438.
- Fernández AS, Padola NL, Estein SM. (1994). El calostro, fuente de transferencia de la inmunidad materna. *Ciencia Veterinaria.* 4(8): 214 - 217.

- Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. (1995). Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells in vivo. *Nature* 373(6511): 255 – 257.
- Foo SY, Phipps S. (2010). Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology. *Mucosal Immunology*. 3(6): 537 – 544.
- Forrest BD, LaBrooy JT, Robinson P, Dearlove CE, Shearman DJ. (1991). Specific immune response in the human respiratory tract following oral immunization with live typhoid vaccine. *Infect. Immun.* 59(3): 1206 - 1209.
- Frauwirth KA, Thompson CB. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest*; 109(3): 195 - 299.
- Galaktionov VG. (2004). Evolutionary development of the immunoglobulins super family. *Izv. Akad. Nauk Ser Biol*, 31(2): 133 - 145.
- Gans HA, Arvin AM, Galinus J, Logan L, DeHovitz R, Maldonado Y. (1998). Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *JAMA*. 280(6): 527 - 532.
- Gasparoni A, Avanzini A, Ravagni PF, Chirico G, Rondini G, Severi F. (1992). IgG subclasses compared in maternal and cord serum and breast milk. *Arch. Dis. Child*. 67(1): 41 - 43.
- Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G. (2003). Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immune proliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol. Neonate*. 84(4): 297 - 303.
- Gebel HM, Scott JR, Parvin CA, Rodey GE. (1983). In vitro immunization to KLH. II. Limiting dilution analysis of antigen-reactive cells in primary and secondary culture. *J. Immunol*. 130(1): 29 - 32.
- Gerdts V, Mutwiri GK, Tikoo SK, Babiuk LA. (2006). Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. Special Issue of Veterinary Research ‘Mucosal immunity in domestic animals’, *Veterinary Research*. 37(3): 487 - 510.
- Germain RN. (1999). Antigen processing and presentation. *Fundamental Immunology* 4ta. Edición. Raven Press Publications. USA. Pp. 242 – 247.

- Gitlin D, Hitzig WH, Janeway CA. (1956). Multiple serum protein deficiencies in congenital and acquired agammaglobulinemia. *J. Clin. Invest.* 35(11): 1199 - 1204.
- Goldsby R, Thomas JH, Osborne B, Kuby J. (2004). *Inmunología*. 5ta. edición. McGraw Hill. México, México. Pg. 665.
- Goronzy J, Weyand CM. (2007). The innate and adaptive immune systems. *Cecil Medicine*. 23ra. Edición. Philadelphia Saunders, Elsevier. USA. Pp. 42 – 50.
- Haas W, Pereira P, Tonegawa S. (1993). Gamma/delta cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 637 – 685.
- Haber E, Stone M. (1967). Extensive degradation of antibody by pepsin. *Biochemistry.* 6(7): 1974 - 1980.
- Häcker G, Adam S, Wagner H. (1995). Interaction between  $\gamma\delta$  T cells and B cells regulating IgG production. *Immunology* 84(3): 105 – 110.
- Halliwell R, Gorman NT. (1992). *Inmunología clínica veterinaria*. Editor Zaragoza Acribia, Editorial Aula Magna. España. Pp. 173 - 206.
- Hanania NA, Sockrider M, Castro M, Holbrook JT, Tonascia J, Wise R, Atmar RL. (2004). Immune response to influenza vaccination in children and adults with asthma: effect of corticosteroid therapy. *J. Allergy Clin Immunol.* 113(4):717- 724.
- Hanson L, Brandzaeg P. (1980). The mucosal defense system. In *Immunologic disorders in infants and children*. Stiehm E.R, editor. W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA. Pp. 137 – 164.
- Hanson L, Brandtzaeg P. (1989). The mucosal defence system. In E. R. Stiehm (ed.) *Immunological disorders in infants and children*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, USA. Pg. 116.
- Harty JT, Badovinac VP. (2002). Influence of effector molecules on the CD8+ T cell response to infection. *Immunology.* 14(3): 360 – 365.
- Hieshima K, Ohtani H, Shibano M, Izawa D, Nakayama T, Kawasaki Y, Shiba F, Shiota M, Katou F, Saito T, Yoshie O. (2003). CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J. Immunol.* 170(3): 1452 - 1461.

- Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. (1986). Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur. J. Immunol.* 16(10): 1297 – 1301.
- Holtmeier W, Kabelitz D. (2005). "Gamma delta T cells link innate and adaptive immune responses". *Chemical immunology and allergy* 86: 151 – 183.
- Insoft RM, Sanderson IR, Walker WA. (1996). Development of immune function in the intestine and its role in neonatal diseases. *Pediatr. Clin. North Am.* 43(2): 551 - 571.
- Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan A, Simister NE. (1997). Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology.* 92(1): 69 – 74.
- Jaspan Heather B, Lawn Stephen D, Safrit Jeffrey T, Bekker Linda-Gail. (2006). The maturing immune system: Neonatal immunity. *AIDS.* 20(4): 483 - 494.
- Jertborna M, Svennerholma AM, Holmgren J. (1996). Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent B subunit-O1/O139 whole cell cholera vaccine. *Vaccine.* 14(15): 1459 - 1465.
- Jonsson R, Brokstad KA, Lipsky PE, Zouali M. (2001). B lymphocyte selection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 22(12): 653 - 740.
- Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman JP, Lamm ME. (1991). The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(19): 8796 – 8880.
- Kerr MA. (1990). The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* 271(2): 285 – 296.
- Killian M, Russell MW. (1994). Function of mucosal immunoglobulins. In: *Handbook of Mucosal Immunology.* P.L. Ogra, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J.R. McGhee, J. Bienenstock, (eds.) Orlando, Florida, USA: Academic Press. Pp. 127 – 137.
- Kim PH, Kagnoff MF. (1990). Transforming growth factor  $\beta$  is a costimulator of IgA production. *J. Immunol.* 144(9): 3411 – 3416.

- Kiyono H, Bienenstock J, McGhee JR, Ernst PB. (1992). The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg. Immunol.* 4(2): 54 - 62.
- Kiyono H, Fukuyama S. (2004). NALT - versus peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4(9): 699 – 710.
- Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S, Nanno M, Ishikawa H. (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(13): 6147 – 6151.
- Kosco-Vilbois MH, Gray D, Scheidegger D, Julius M. (1993). Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen presenting cells: induction of B7/BB1 and up regulation of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 178(6): 2055 – 2066.
- Kozlowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR, Flanigan TP. (1997). Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect. Immun.* 65(4): 1387 – 1394.
- Kraehenbuhl J, Neutra MR. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72(4): 853 - 879.
- Kroemer G, Cuende E, Martínez C. (1993). Compartmentalization of the peripheral immune system. *Advances in immunology.* 53: 157 - 216.
- Lahn Michael. (2000). The role of  $\gamma\delta$  T cells in the airways. *J. Mol. Med.* 78(8): 409 – 425.
- Lamm ME. (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 311 – 340.
- Lañez Pareja Enrique. (2006). Órganos y tejidos del sistema inmune. Departamento de microbiología y biotecnología. Universidad de Granada. España. Pp. 157 – 169.
- Lazarus NH, Kunkel EJ, Johnston B, Wilson E, Youngman KR, Butcher EC. (2003). A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasma blasts. *J. Immunol.* 170(7): 3799 - 3805.
- Levy O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Reviews Immunology.* 7(5): 379 – 390.

- Lewis DB y Wilson CB. (2001). Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO (eds). infectious diseases of the fetus and newborn infant. Philadelphia, USA. WB Saunders Company, Fifth Edition, Pp. 130 - 138.
- Lewis DB. (2004). Host defense mechanisms against viruses. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH (eds). Fetal and neonatal physiology. Philadelphia. WB Saunders. 3 edition. Pp. 1490 - 1511.
- Lewis DB, Tu W. (2004). The physiologic immunodeficiency of immaturity. In: Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA (eds). Immunologic disorders in infants and children. Philadelphia. Elsevier Saunders Company, fifth Edition. Pp. 687 - 760.
- Lilo KM. (1988). Evaluation of measles immune response in children and adult in Baghdad. *Microbiology*, 32(4): 259-264.
- Lipsky PE. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmunedisease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* 2(9): 764 - 766.
- Mackay CR, Marston WL, Dudler L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171(3): 801 - 817.
- Maclennan I, Casamayor-Palleja M, Toellner K, Gulbranson-Judge A, Gordon J. (1997). Memory B-cell clones and the diversity of their members. *Semin. Immunol.* 9(4): 229 - 234.
- Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R $\beta$ - deficient mice. Implications for the non redundant function of IL-2. *Immunity.* 17(2): 167 – 178.
- Maloy KJ, Powrie F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunol.* 2(9): 816 – 822.
- Manz RA, Thiel A, Radbruch A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature.* 388(6638): 133 - 134.
- Margni RA. (1996). *Inmunología e inmunoquímica*. 5ta. edición. Ed. Médica Panamericana. México. Pp. 412 – 415.
- Marodi L. (2002). Down-regulation of Th1 responses in human neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 128(1): 1-2.

- Marshall-Clarkle S, Reen D, Tasker L, Hassan J. (2000). Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunology*. 21(1): 35-41.
- Martinez X, Brandt C, Saddallah F, Tougne C, Barrios C, Wild F, Dougan G, Lambert PH, Siegrist CA. (1997). DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94(16): 8726 - 8731.
- Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC, Rudd PM, Woof JM, Dwek RA. (1998). The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fcα receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 373: 2260 – 2272.
- Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. (1992). Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(15): 6901 – 6905.
- McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10(2): 75 - 88.
- McGhee JR, Kiyono H. (1999). The mucosal immune system. *Fundamental Immunology*, WE Paul (edi) Fourth Edition. Lippincott-Raven Publishers. USA. Pp. 909 - 930.
- Melchers F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 578 - 584.
- Mestecky J, Russell MW. (1986). IgA subclasses. *Monogr. Allergy* 19(3): 277 – 301.
- Mestecky J, McGhee JR. (1987). Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular reactions involved in IgA biosynthesis and immune responses. *Adv. Immunol.* 40: 153 – 245.
- Min B, Legge KL, Caprio JC, Li L, Gregg R, Zaghoulani H. (2000). Differential control of neonatal tolerance by antigen dose versus extended exposure and adjuvant. *Cell Immunol.* 200(1): 45 - 55.
- Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. (1990). Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J. Exp. Med.* 171(3): 597 – 613.

- Monteiro RC, Van de Winkel JC. (2003). IgA Fc receptors. *Annual Review of Immunology*. 21: 177 - 204.
- Mostov KE, Kraehenbuhl JP, Blobel G. (1980). Receptor-mediated trans cellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger trans membrane forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(12): 7257 – 7261.
- Mostov KE. (1994). Trans epithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 63 – 84.
- Nakagawa T, Nakagawa N, Ambrus JL. Jr, Fauci AS. (1988). Differential effects of interleukin 2 vs B cell growth factor on human B cells. *The Journal of Immunology*. 140(2): 465 - 469.
- Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, Francois C, Jacques Y, Adelstein S, Leonard WJ. (1994). Hetero dimerization of the IL-2 receptor beta and gamma chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*. 369(6478): 330 – 333.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. (2001). Cell contact dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor- $\beta$ . *J. Exp. Med.* 194(5): 629–644.
- Newby TJ. (1984). Protective immune responses in the intestinal tract. En: *Local immune responses of the gut*. T.J. Newby C.R. Stokes (Eds.), CRC Press, Inc., Florida USA. Pp. 143 - 198.
- Newby TJ, Stokes CR. (1984). The intestinal immune system and oral vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6(1-2): 67 - 105.
- Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeong KI, Gonzalez AM, Saif LJ. (2007). Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117(3-4): 236 - 248.
- Nishimura H, Emoto M, Hiromatsu K, Yamamoto S, Matsuura K, Gomi H, Ikeda T, Itohara S, Yoshikai Y. (1995). The role of gamma delta T cells in priming macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol.* 25(5): 1465 - 1468.

- Ogawa T, Kusumoto Y, Kiyono H, McGhee JR, Hamada S. (1992). Occurrence of antigen-specific B cells following oral or parenteral immunization with porphyromonas gingivalis fimbriae. *Int. Immunol.* 4(9): 1003 - 1010.
- Ogra PL, Ogra SS. (1973). Local antibody response to polio vaccine in the human female genital tract. *J. Immunol.* 110(5): 1307 – 1311.
- Okahashi N, Yamamoto M, VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Bluethmann H, Hiroi T, Kiyono H, McGhee JR. (1996). Oral immunization of IL-4 knockout mice with a recombinant Salmonella strain or cholera toxin reveals that CD4+ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal IgA responses. *Infect. Immun.* 64(5): 1516 – 1525.
- Pabst R, Binns RM. (1994). The immune system of the respiratory tract in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43(1-3): 151 – 160.
- Paniagua MJ, Berron RD, Garcia ML, Zaragoza JM.(2003). El sistema inmune del recién nacido. *Alergia, Asma e Inmunologías Pediátricas.* 12(2): 63 – 68.
- Pankow W, Von-Wichert P. (1988). M cell in the immune system of the lung. *Respiration* 54(4): 209 – 219.
- Parham Peter. (2006). *Inmunología*. Ed. Médica Panamericana. México. Pp. 160 – 162.
- Peltonen J, Alitalo I, Karaharju E, Heliö H. (1984). Distraction of the growth plate. Experiments in pigs and sheep. *Acta orthopaedica Scandinavica.* 55(3): 359 - 362.
- Pérez A. (2010). *Inmunoneonatología: El sistema inmune neonatal*. *Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas*. Blog de EMEI. Powered by WordPress & Atahualpa. México. Pp. 1 – 3.
- <http://epidemiologiamolecular.com/08/03/2010/inmunoneonatologia/>
- Fecha de consulta, noviembre 2010.
- Persson CG, Gustafsson B, Erjefä JS, Sundler F. (1993). Mucosal exudation of plasma is a non-injurious intestinal defence mechanism. *Allergy* 48(8): 581 – 586.
- Persson CG, Anderson M, Grieff L, Svensson C, Erjefä JS. (1995). Airway permeability. *Clin. Exp. Allergy* 23(9): 807 – 814.

- Persson CG, Erjefält JS, Greiff L, Erjefält I, Korsgren M, Linden M, Sundler F, Andersson M, Svensson C. (1998). Contribution of plasma-derived molecules to mucosal immune defence, disease and repair in the airways. *Scand. J. Immunol.* 47(4): 302 – 313.
- Picker LJ, Butcher EC. (1992). Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 561 - 591.
- Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y. (2001). Lung mucosal immunity: immunoglobulin – A revisited. *Eur. Respir. J.* 18(3): 571 – 588.
- Pumphrey RS. (1986). Computer models of the human immunoglobulins. Binding sites and molecular interactions. *Immunol. Today.* 7(7): 206 – 211.
- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. (2008). The bowel: A key component of the immune system. *Rev. esp. enferm. dig.* 100(1): 29 – 34.
- Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, Kopf M. (1994). The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science.* 264(5158): 561 – 563.
- Reterink TJ, Van-Zandbergen G, Van-Egmond M, Morton CH, Van de Winkel JG, Daha MR. (1997). Size-dependent effect of IgA on the IgA Fc receptor (CD89). *Eur. J. Immunol.* 27(9): 2219 – 2224.
- Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México.* 48(1): 62 - 71.
- Robledo A, Robledo T. (2003). *Alergo-Dermatología Clínica.* Ediciones Ergon. Madrid, España. Pg. 63.
- Rogers LA, Zlotnik A, Lee F, Shortman K. (1991). Lymphokine requirements for the development of specific cytotoxic T cells from single precursors. *Eur. J. Immunol.* 21(4): 1069 - 1072.
- Roifman CM. (2000). Human IL-2 receptor alpha chain deficiency. *Pediatr. Res.* 48(1): 6–11.
- Rondini G, Chirico G. (1999). Hematopoietic growth factor levels in term and preterm infants. *Curr. Opin. Hematol.* 6(3): 192 - 197.

- Roppa L. 2008. La importancia del cerdo en la medicina humana. Internacionales: El cerdo y la medicina. Aula magna. Madrid, España. Pp. 102 - 106.
- Salvi S, Holgate ST. (1999). Could the airway epithelium play an important role in mucosal IgA production? *Clin. Exp. Allergy*. 29(12): 1597 – 1605.
- Schneider D. (2005). Innate Immunity - Lecture 4: Plant immune responses. Editorial Springe. Stanford University Department of Microbiology and Immunology. Philadelphia, USA. Pp. 121 – 129.
- Secchiero P, Zella D, Curreli S, Mirandola P, Capitani S, Gallo RC, Zauli G. (2000). Engagement of CD28 modulates CXC chemokine receptor 4 surface expression in both resting and CD3-stimulated CD4 T cells. *J. Immunol*. 164(8): 4018 - 4024.
- Seddon B, Mason D. (1999). Peripheral auto antigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J. Exp. Med*. 189(5): 877 – 882.
- Shen L. (1992). Receptors for IgA on phagocytic cells. *Immunol. Res*. 11(3-4): 273 – 282.
- Shikina T, Hiroi T, Iwatani K, Jang MH, Fukuyama S, Tamura M, Kubo T, Ishikawa H, Kiyono H. (2004). IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol*. 172(10): 6259 - 6264.
- Sibille Y, Reynolds HY. (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defence and injury. *Am. Rev. Respir. Dis*. 141(2): 471 – 501.
- Siegrist CA. (2001). Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*. 19(25-26): 3331 – 3346.
- Siegrist CA. (2003). Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 21(24): 3406 - 3412.
- Siegrist CA, Aspinal R. (2009). B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nature Reviews Immunology*. 9(3): 185 – 194.
- Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. (1995). Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J. Virol*. 69(3): 1895 - 1902.
- Slifka MK, Ahmed R. (1996). Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends. Microbiol*. 4(10): 394 – 400.

- Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. (1998). Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. *Immunity*. 8(3): 363 – 372.
- Sinkora M, Butler JE. (2009). The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and comparative immunology*. 33(3): 273 – 283.
- Sminia T, Van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SH. (1989). Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit. Rev. Immunol.* 9(2): 119 – 150.
- Spiekermann GM. (2002). Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp. Med.* 196(3): 303 – 310.
- Splawski JB, Jelinek DF, Lipsky PE. (1991). Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 87(2): 545 - 553.
- Sprent J. (1997). Immunological memory. *Curr. Opin. Immunol.* 9(3): 371 - 379.
- Springer TA. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76(2): 301 - 314.
- Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, Takahashi I, Kiyono H, McGhee JR. (1994). Mucosal immunity to infection with implication for vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* 6(4): 572 – 583.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. (1998). *Inmunología Básica y Clínica*. Editorial Manual Moderno. México, D.F. Pp. 195 – 210.
- Stokes CR, Southill JF, Turner MW. (1975). Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* 255(5511): 745 – 746.
- Taylor HP, Dimmock NJ. (1985). Mechanisms of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J. Exp. Med.* 161(1): 198 – 209.
- Tew JG, Mandel TE. (1979). Prolonged antigen half-life in the lymphoid follicles of specifically immunized mice. *Immunology*. 37(1): 69 - 76.
- Timens W, Boes A, Rozeboom-Uiterwijk T, Poppema S. (1989). Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J. Immunol.* 143(10): 3200 – 3206.
- Tizard IR. (2004). *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Philadelphia, USA. Pg. 215.

- Tomasi TB Jr, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. (1965). Characterization of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.* 121(1): 101 – 124.
- Vigano A, Esposito S, Arienti D, Zagliani A, Massironi E, Principi N, Clerici M. (1999). Differential development of type 1 and type 2 cytokines and beta-chemokines in the ontogeny of healthy newborns. *Biol. Neonate.* 75(1): 1 - 8.
- Villadangos JA. (2001). Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol. Immunol.* 38(5): 329 – 346.
- Walker WE, Goldstein DR. (2007). Neonatal B cells suppress innate Toll-Like receptor immune responses and modulate alloimmunity. *The Journal of Immunology.* 179(3): 1700 - 1710.
- Whaley Kevin J, Zeitlin Larry. (2001). Antibodies as mucosal protectants. *Annales de l'Institut Pasteur. Mapp Biopharmaceutical, Inc.* 7: 83 - 100.
- Wilson AD, Robinson A, Irons L, Stokes CR. (1993). Adjuvant action of cholera toxin and pertussis toxin in the induction of IgA antibody response to orally administered antigen. *Vaccine* 11(2): 113 - 118.
- Wu HY, Russell MW. (1997). Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunologic Research.* 16(2): 187 – 201.
- Yong L, Arpin C. (1997). Germinal center development. *Immunological Reviews.* 156(1): 111 – 126.
- Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20(6): 769 – 783.
- Youngman KR, Fiocchi C, Kaetzel CS. (1994). Inhibition of IFN- $\gamma$  activity in supernatants from stimulated human intestinal mononuclear cells prevents up regulation of the polymeric Ig receptor in an intestinal epithelial cell line. *J. Immunol.* 153(2): 675 – 681.

Zenteno Cosme Rosa (2011). Evaluación de la respuesta inmune sérica y mucosal ante la inmunización perinatal con ovoalbúmina en cerdos convencionales. Tesis de licenciatura en proceso para MVZ de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Zuckermann FA. (1999). Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 72(1-2): 55 - 66.